



Escola Superior de Saúde Egas Moniz

Mestrado em Biologia Molecular em Saúde

Análise genotípica de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*
oriundas da Guiné-Bissau

Joana Mara Marques Sotero

2015



Escola Superior de Saúde Egas Moniz

Mestrado em Biologia Molecular em Saúde

Análise genotípica de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*
oriundas da Guiné-Bissau

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular
em Saúde pela Escola Superior de Saúde Egas Moniz

Orientador: Doutora Isabel Portugal

Co-orientador: Doutor João Perdigão

Joana Mara Marques Sotero

Abril 2015

Agradecimentos

À Doutora Isabel Portugal e ao Doutor João Perdigão por me terem acolhido na realização deste trabalho, pela amizade, apoio e disponibilidade sempre demonstrados.

À Mestre Carla Silva por todo o auxílio e amizade.

A todos os colegas pelo bom ambiente de trabalho e auxílio sempre demonstrados.

Por fim a toda a minha família pelo apoio que sempre me deram.

Resumo

A tuberculose (TB) representa actualmente um problema de saúde pública. A maioria dos casos, em 2013, ocorreu na Ásia e na Região Africana, particularmente na África Subsaariana, onde se detectaram na Guiné-Bissau 387 novos casos de TB por 100 000 habitantes. No mesmo ano detectaram-se em Portugal 26 novos casos por cada 100 000 habitantes.

O presente estudo compreende a análise genotípica, através das técnicas de *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit – Variable Number of Tandem Repeat* (MIRU-VNTR) e Spoligotyping de isolados clínicos oriundos da Guiné-Bissau e da Região de Saúde de Lisboa. Permitiu caracterizar e identificar estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) responsáveis por casos de TB na Guiné-Bissau e posicioná-las num contexto macroepidemiológico e comparar estirpes provenientes da Guiné-Bissau, com estirpes circulantes na Região de Saúde de Lisboa, incluindo a comparação com isolados de indivíduos nacionais da Guiné-Bissau. A caracterização e identificação de estirpes de *M. tuberculosis* responsáveis por casos de TB, na sua maioria resistentes, oriundos da Guiné-Bissau revelou uma maior incidência da linhagem Beijing e LAM9, e na Região de Lisboa as linhagens mais prevalentes foram a LAM4, T1 e Beijing.

Verificou-se que a TB, em Portugal e na Guiné-Bissau, afecta mais o sexo masculino e está a surgir em grupos etários mais novos (20-30 anos). Através da comparação com bases de dados internacionais, verificou-se que as estirpes Beijing oriundas da Guiné-Bissau poderão estar relacionadas com fluxos migratórios entre a Guiné-Bissau e países da antiga União Soviética.

A comparação entre isolados oriundos da Guiné-Bissau com isolados da região de Lisboa permitiu verificar que os imigrantes guineenses em Portugal apresentam uma estrutura populacional de *M. tuberculosis* semelhante à portuguesa, o que sugere que a TB endémica em Portugal assume uma maior importância nesta comunidade. A detecção de clusters MIRU-VNTR aponta para a ocorrência de transmissão de TB multirresistente nas regiões estudadas.

Palavras-chave: MIRU-VNTR, Spoligotyping, Multirresistência, Lisboa.

Abstract

Nowadays tuberculosis (TB) represents a public health problem. Most cases in 2013 occurred in Asia and in the African Region, particularly in sub-Saharan Africa, where, in Guinea-Bissau was detected 387 new cases of TB per 100 000 inhabitants. At the same year, in Portugal were detected 26 new cases per 100 000 inhabitants.

This study comprehends the genotypic analysis, through Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number of Tandem Repeat (MIRU-VNTR) and Spoligotyping, of clinical isolates from Guinea-Bissau and the Lisbon Health Region. This work allowed us to characterize and identify *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) strains responsible for TB cases in Guinea-Bissau as well as its genetic diversity. It also allowed us to position these isolates in a macroepidemiologic context, and compare strains from Guinea-Bissau with circulating strains in the Lisbon Region of Health, including strains from Guinea-Bissau immigrants.. The characterization and identification of *M. tuberculosis* strains responsible for TB cases, mostly resistant, coming from Guinea-Bissau revealed a higher prevalence of Beijing lineage strains, followed by (sub)-lineage LAM9, and in the Lisbon Health Region a high prevalence of LAM4, T1 and Beijing strains.

Regarding patient data, the comparison between Portugal and Guinea-Bissau clearly shows that males are more affected and that TB appears at younger ages between 20-30 years. The comparison of the genotypic data against international databases suggests that the prevalence of the Beijing lineage in Guinea-Bissau might be associated with migratory events between Guinea-Bissau and former Soviet Union countries. The joint analysis of Guinea-Bissau and Lisbon clinical isolates show that immigrants coming from Guinea-Bissau in Portugal have a *M. tuberculosis* population structure similar to the Portuguese structure. This suggests that endemic TB in Portugal probably assumes a higher role in this community. The detection of MIRU-VNTR clusters suggests ongoing recent transmission of multidrug resistant TB in the studied regions.

Key words: MIRU-VNTR, Spoligotyping, Multidrug-resistant, Lisbon.

ÍNDICE

Índice de Figuras	VIII
Índice de Tabelas	IX
Abreviaturas.....	X
1. Introdução	1
1.1 Enquadramento histórico	1
1.2 Tuberculose no mundo.....	3
1.3 Portugal e Guiné-Bissau	4
1.4 Taxonomia	5
1.5 Características gerais das micobactérias	6
1.6 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
1.7 Tuberculose.....	10
1.7.1 Infecção e modo de transmissão	10
1.8 Tuberculose resistente.....	13
1.9 Diagnóstico Microbiológico	15
1.10 Tratamento	18
1.11 Epidemiologia molecular	20
1.12 Objectivos	25
2. Materiais e Métodos	26
2.1 Isolados Clínicos.....	26
2.2 Extracção de DNA	27
2.3 Genotipagem por MIRU-VNTR	28
2.3.1 Misturas de reacção.....	28
2.3.2 Amplificação	29
2.3.3 Análise do produto por electroforese em gel de agarose	30
2.3.4 Análise do produto por electroforese capilar	30
2.3.5 Interpretação dos resultados	31
2.4 Spoligotyping.....	32
2.4.1 Preparação da membrana	32
2.4.2 Amplificação	32
2.4.3 Hibridação	34
2.4.4 Detecção da quimioluminescência.....	34
2.4.5 Regeneração da membrana	35
2.4.6 Interpretação dos resultados	35

3. Resultados.....	36
3.1 Caracterização dos isolados clínicos oriundos da Guiné-Bissau	36
3.1.1 Caracterização da amostra.....	36
3.1.2 Genotipagem por Spoligotyping	37
3.1.3 Genotipagem por MIRU-VNTR	39
3.2 Caracterização de isolados clínicos provenientes de doentes da Região de Saúde de Lisboa com nacionalidade guineense.....	41
3.2.1 Caracterização da amostra.....	41
3.2.2 Genotipagem por Spoligotyping	43
3.3 Caracterização dos isolados clínicos resistentes provenientes da Região de Saúde de Lisboa.....	46
3.3.1 Caracterização da amostra.....	46
3.3.2 Genotipagem por Spoligotyping	47
3.3.3 Genotipagem por MIRU-VNTR	49
3.4 Comparação dos isolados oriundos da Guiné-Bissau com os isolados provenientes da Região de Saúde de Lisboa.....	51
3.4.1 Genotipagem por Spoligotyping	51
3.4.2 Genotipagem por MIRU-VNTR	54
4. Discussão	58
5. Conclusão	64
6. Bibliografia.....	66
7. Anexos.....	74
7.1 Anexo 1: Convenção MIRU-VNTR	74
7.2 Anexo 2: Sequência de <i>Primers</i>	75
7.3 Anexo 3: Preparação de soluções para extracção de DNA.....	77
7.4 Anexo 4: Preparação das soluções para Spoligotyping	78
7.5 Anexo 5: Diluição dos oligonucleótidos.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Novos casos de TB no mundo em 2013, por 100 000 habitantes.....	3
Figura 2 - Evolução da taxa de incidência da TB em Portugal e na Guiné-Bissau de 2000 até 2013.....	4
Figura 3 - Esquema da estrutura do invólucro do <i>M. tuberculosis</i>	6
Figura 4 - Processo de Infecção pelo <i>M. tuberculosis</i>	11
Figura 5 - Genoma do <i>M. tuberculosis</i>	23
Figura 6 - Identificação alélica por MIRU-VNTR do locus 40.....	31
Figura 7 - Interpretação dos resultados por Spoligotyping.	35
Figura 8 - Número de isolados oriundos da Guiné-Bissau por faixa etária e género.	36
Figura 9 – Dendograma de análise genotípica por MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> dos 13 isolados clínicos oriundos da Guiné-Bissau..	40
Figura 10 - Número de isolados clínicos com diagnóstico em Portugal provenientes de doentes de nacionalidade guineense por faixa etária e género.	41
Figura 11 – Dendograma de análise genotípica por Spoligotyping dos isolados clínicos com diagnóstico em Portugal mas nacionalidade da Guiné-Bissau.	44
Figura 12 – Dendograma de análise genotípica por MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> dos 17 isolados clínicos resistentes provenientes da região de saúde de Lisboa	50
Figura 13 - Análise genotípica por Spoligotyping dos isolados clínicos com diagnóstico em Portugal e oriundos da Guiné-Bissau.	52
Figura 14 – Dendograma de análise genotípica por MIRU-VNTR para MIRU 12 <i>loci</i> dos 30 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	55
Figura 15 – Dendograma de análise genotípica por MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> dos 30 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Orientações para o tratamento de TB-MR	19
Tabela 2 - Volume de cada componente para preparação das misturas de PCR <i>multiplex</i>	28
Tabela 3 - Volume de cada componente para preparação das misturas de reacção de PCR <i>simplex</i>	29
Tabela 4 - Programa de PCR <i>multiplex</i>	29
Tabela 5 - Volume de cada componente para preparação da mistura de PCR de Spoligotyping.	33
Tabela 6 - Programa de PCR de Spoligotyping.....	33
Tabela 7 - Dados demográficos e o padrão de susceptibilidade dos isolados clínicos oriundos da Guiné-Bissau.....	37
Tabela 8 - Perfil de Spoligotyping dos isolados clínicos em estudo oriundos da Guiné-Bissau em 2012.....	38
Tabela 9 - Dados demográficos dos doentes de nacionalidade guineense e susceptibilidade de isolados clínicos com diagnóstico em Portugal entre 2008 e 2009. 42	
Tabela 10 - Perfil de Spoligotyping dos isolados clínicos em estudo com diagnóstico em Portugal entre 2008 e 2009 mas com nacionalidade da Guiné-Bissau.....	45
Tabela 11 - Dados demográficos dos isolados clínicos com diagnóstico em Portugal. . 46	
Tabela 12 - Perfil de Spoligotyping dos isolados clínicos em estudo Portugueses.....	48
Tabela 13 - Número de isolados em estudo de acordo com o SIT e perfil octal. Percentagens calculadas segundo o total por coluna.	53
Tabela 14 - Convenção MIRU-VNTR.	74
Tabela 15 - Sequência de <i>Primers</i> utilizados para realização do PCR por MIRU-VNTR.	75
Tabela 15(cont.) - Sequência de <i>Primers</i> utilizados para realização do PCR por MIRU-VNTR.	76
Tabela 16 - Diluição dos oligonucleótidos utilizados no Spoligotyping.....	79
Tabela 16(cont.) - Diluição dos oligonucleótidos utilizados no Spoligotyping.	80

ABREVIATURAS

a.C. - Antes de Cristo

ARS- Associação Regional de Lisboa

BCG - Bacilo de Calmette e Guérin

CPLP – Comunidade de Países de Língua Portuguesa

CMT - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

CR - *Complement receptor*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DR- *Direct Repeat*

DMSO – Dimetilsulfóxido

IHMT- Instituto de Medicina e Higiene Tropical

INF – Interferão

IS - *Insertion Sequence*

MIRU- VNTR - *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats*

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF - *Open Reading Frame*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Rcf – relative centrifugal force

RNA - ácido ribonucleico

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*

TB - Tuberculose

TB-MR - Tuberculose Multirresistente

TB-XDR - Tuberculose Extensivamente Resistente

TNF – *Tumoral Necrosis Factor*

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

ZN- Ziehl-Neelsen

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENQUADRAMENTO HISTÓRICO

Os primeiros vestígios de tuberculose (TB) foram encontrados em ossos humanos com 6000 e 8000 anos a.C., no período neolítico (Formicola et al., 1987). No mesmo período encontraram-se vestígios da doença espalhados pelo mundo: Europa, Egipto e Continente Americano (HersHKovitz et al., 2008; Cave, 1939). Em 1481 foi descrito o primeiro caso de TB em Portugal, a doente foi a Madre Priora do Mosteiro de Jesus, que terá transmitido a doença à Infanta Santa Joana, falecida em 1490. Na primeira metade do século XVI, Girolamo Frescatoro, estabeleceu a noção de transmissão e os padrões de contagiosidade, sugerindo a transmissão inter-humana. Na década de oitenta, Zacarias SylviuS, descreveu o tubérculo como unidade lesional da TB e mais tarde Richard Morton verificou que, para além dos pulmões, outros órgãos eram infectados. Nos séculos XVII e XVIII houve várias contradições sobre a contagiosidade da doença, a partir desta altura verifica-se a expansão da TB por toda a Europa, atingido o seu pico nos séculos XVIII e XIX. É precisamente nestes séculos que a doença está descrita como sendo responsável por um quarto da mortalidade global europeia, a chamada Peste Branca (Young, 1998). Com o surto devastador, a população rural transferiu-se para as grandes cidades, que começaram a implementar medidas higieno-sanitárias numa tentativa de combate à doença (Burdass, 2009; Pósa et al., 2012).

Robert Koch, teve um papel fulcral no diagnóstico da TB. No dia 24 de Março de 1882 (proclamado dia mundial da TB) deu a conhecer o microrganismo responsável pela doença – o *Mycobacterium tuberculosis* (Sakula, 1983b). Posteriormente descreveu a tuberculina, que pensou ser uma forma terapêutica, no entanto, em 1905 Von Pirquet apresenta-a como um teste de diagnóstico.

Numa tentativa de combate à TB foram criados sanatórios em zonas montanhosas onde o nível de incidência era menor. Apesar de terem sido ineficazes na cura permitiram evitar que a doença se espalhasse mais pela sociedade. O primeiro sanatório Português foi criado em 1854 no Funchal, pela Rainha D. Amélia. Em 1913, Albert Calmette e Camille Guérin desenvolvem a vacina que ainda é

utilizada como profilaxia para a TB: a vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin). Estes investigadores perceberam que expondo culturas de bacilos bovinos em meio com glicerina e bÍlis bovina, estes iam perdendo a virulência. Conseguiram assim obter um bacilo sem virulência mas com a sua capacidade imunogénica, o BCG. Estava assim criada a vacina antituberculosa, mas faltava um medicamento capaz de curar a TB, que surge em 1944, desenvolvido por Selman A. Waksman, a estreptomicina, o primeiro antibacilar a ser descoberto. Estava aberta a porta para a descoberta de outros antibacilares (Sakula, 1983a). A terapêutica encontrada permitiu diminuir o nível de incidência da TB até 1985. Nesta altura surgiu uma epidemia de VIH que aumentou drasticamente a incidência da TB. Em 1993, a doença foi considerada um problema emergente a nível global (Burdass, 2009; Fine et al., 1999).

Em 1998 foi determinada a sequência completa do genoma do *M. tuberculosis*, que permitiu vários avanços na compreensão biológica da bactéria. O conhecimento da epidemiologia da TB permanece com uma importância vital para o controlo da doença, sobretudo nos países com elevada incidência (Cole, 1998).

1.2 TUBERCULOSE NO MUNDO

A TB é uma doença infecciosa que representa actualmente um grave problema de saúde pública, principalmente nos países subdesenvolvidos (Figura 1). A maioria dos casos estimados, em 2013, ocorreu na Ásia (56%), de onde se destaca a China, Índia, Bangladesh, Indonésia e Paquistão; e no continente Africano, em particular na África Subsaariana (29%). Menores proporções de casos ocorreram na região do Mediterrâneo Oriental (8%), na Europa (4%) e na América (3%). Em 2013, a OMS estima que tenham ocorrido cerca de 9 milhões de novos casos e 1,5 milhões de mortes devido à TB por todo o mundo, dos quais 360 000 eram VIH-positivos (WHO, 2014a).

A incidência da TB tem vindo a diminuir lentamente ao longo dos últimos anos e estima-se que, através de um diagnóstico e tratamento eficazes, 37 milhões de vidas tenham sido salvas entre 2000 e 2013. No entanto, dado que a maioria das mortes por TB é evitável, o número de mortos pela doença ainda é inaceitavelmente elevado (WHO, 2014a).

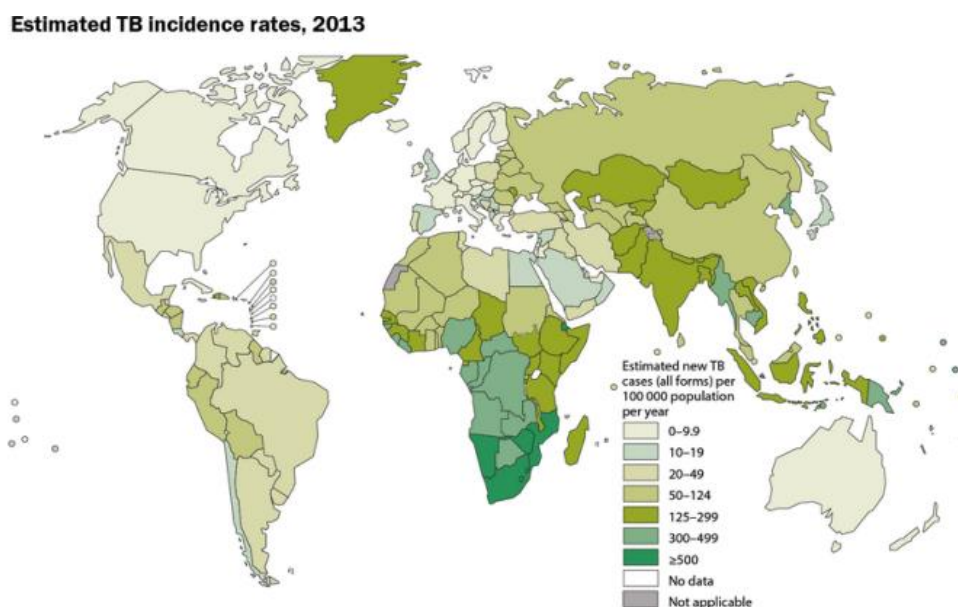


Figura 1 - Novos casos de TB no mundo em 2013, por 100 000 habitantes (WHO, 2014b).

1.3 PORTUGAL E GUINÉ-BISSAU

Portugal e Guiné-Bissau são dois países com ligações históricas e que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP). A Guiné-Bissau é um pequeno país cuja população tem um elevado grau de mobilidade dentro do país mas pouco contacto com a população dos países africanos vizinhos (Källenius et al., 1999). Cerca de um terço da população da África Subsaariana está infectada com *M. tuberculosis* (Dye et al., 1999). No ano de 2000, estima-se que 17 milhões de pessoas na África Subsaariana foram infectadas com *M. tuberculosis* e VIH, o que representa 70% de todas as pessoas co-infectadas no mundo (Corbett et al., 2003).

Na Figura 2 é possível avaliar a evolução da TB em Portugal e na Guiné-Bissau de 2000 até 2013. Portugal tem vindo a conseguir controlar o número de novos casos de TB, uma vez que, a sua incidência tem vindo a diminuir nos últimos anos. Pelo contrário, a Guiné-Bissau não está a conseguir atingir um controlo eficaz da doença, pois a incidência tem vindo a aumentar gradualmente desde 2000. Em Portugal registaram-se cerca de 26 novos casos por cada 100 000 habitantes em 2012, enquanto na Guiné-Bissau, no mesmo ano, existiram 382 novos casos por 100 000 habitantes (Figura 2). Portugal registou em 2013 um total de 2292 casos de TB, dos quais 2142 eram novos casos, ou seja, casos sem tratamento anterior. Estes números indicam uma redução de 257 casos em comparação com os 2399 em 2012 (WHO, 2014b).

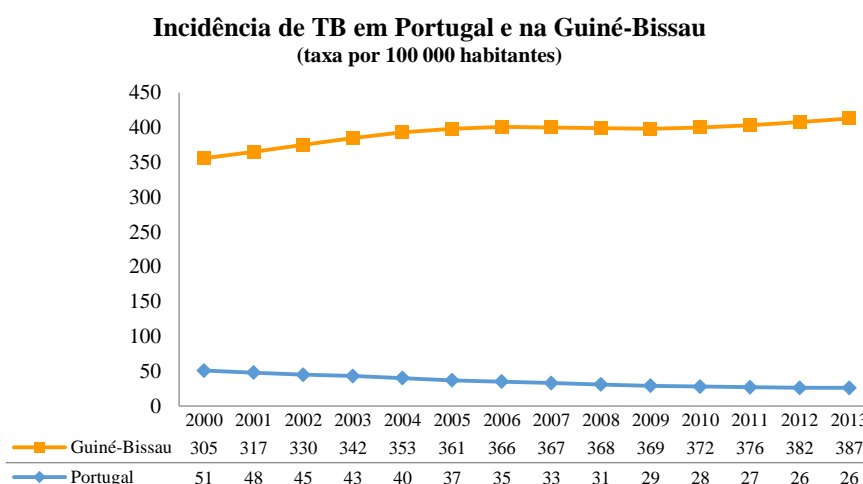


Figura 2 - Evolução da taxa de incidência da TB em Portugal e na Guiné-Bissau de 2000 até 2013 (adaptado de WHO, 2014c).

1.4 TAXONOMIA

As micobactérias estão incluídas na família Mycobacteriaceae, que contém apenas o género *Mycobacterium*. Actualmente, na base de dados “*List of prokaryotic names with standing in nomenclature*” há citação de 170 espécies deste género. Filogeneticamente próximos do *Mycobacterium* estão os géneros *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, o que se reflecte no elevado conteúdo GC que apresentam e ainda pelo facto de também serem produtores de ácidos micólicos (Rastogi et al., 2001).

As micobactérias estão divididas em dois grandes grupos, as micobactérias de crescimento rápido e as de crescimento lento. As de crescimento lento demoram mais de sete dias a formar colónias visíveis e as de crescimento rápido demoram menos de sete dias a formar colónias visíveis a partir de um inóculo diluído. Alguns investigadores compararam o rRNA 16S e verificaram que a filogenia reflecte a divisão entre as micobactérias de crescimento lento e rápido, com uma maior coerência entre espécies de crescimento lento (Stahl et al., 1990).

As micobactérias podem também ser classificadas com base na pigmentação:

- Não cromogénicas – não apresentam produção de pigmentos, p.e., *M. tuberculosis* ou *M. bovis*;
- Fotocromogénicas – produzem pigmentos por foto indução, p.e., *M. marinum* e *M. kansasii*;
- Escotocromogénicas – produzem pigmentos na ausência de luz, p.e., *M. goodii*.

Mais tarde, Runyon, apresentou uma classificação baseada em caracteres fenotípicos, pigmentação e tempo de crescimento:

- Grupo I – micobactérias de crescimento lento fotocromogénicas;
- Grupo II – micobactérias de crescimento lento escotocromogénicas;
- Grupo III – micobactérias de crescimento lento não-cromogénicas;
- Grupo IV – micobactérias de crescimento rápido.

1.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS MICOBACTÉRIAS

As bactérias são organismos procariotas, apresentando uma estrutura relativamente simples. As bactérias representativas do género *Mycobacterium* (micobactérias), são bacilos aeróbios, imóveis, sem esporos e medem cerca de 1 a 10 µm. A sua parede celular tem um elevado conteúdo lipídico de ácidos micólicos, tornando a bactéria resistente à descoloração, após a exposição subsequente a álcoois e ácidos. Esta característica –álcool-ácido resistência – permite uma diferenciação rápida das micobactérias em esfregaços corados (Rastogi et al., 2001).

O invólucro celular das micobactérias é composto por uma membrana plasmática interna, coberta por uma camada espessa de peptidoglicano, arabinogalactano e membrana externa (Figura 3). A camada de peptidoglicano forma a base sobre a qual estão ancorados os arabinogalactanos, um polissacarídeo ramificado composto por D-arabinose e D-galactose. O resíduo terminal de D-arabinose é esterificado a ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular, ligados a moléculas glicolípídicas de superfície. Os componentes lipídicos representam 60% do invólucro celular. Porinas e proteínas de transporte estão integradas em todas as camadas do invólucro celular e representam 15% da sua constituição (Rastogi et al., 2001; Kaur et al., 2009). Muitas das espécies de micobactérias crescem lentamente dividindo-se a cada 12-24 horas e requerendo um período de 2 dias a 8 semanas para que o crescimento seja detectado em cultura (Kaur et al., 2009).

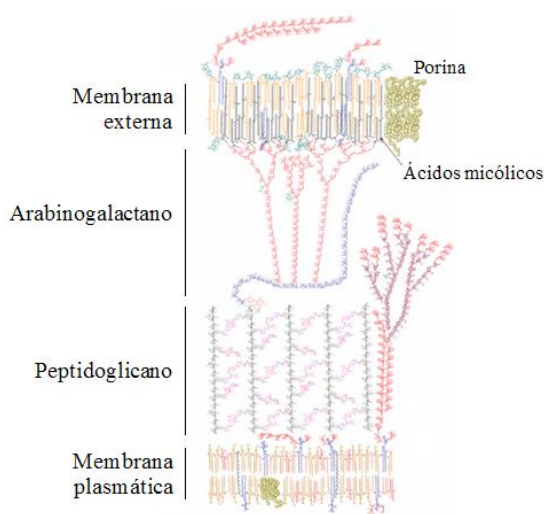


Figura 3 - Esquema da estrutura do invólucro do *M. tuberculosis* (adaptado de Kaur et al., 2009).

1.6 COMPLEXO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) é composto por várias espécies e (sub)-espécies, incluindo o *M. tuberculosis sensu stricto*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, *M. orygis* e *M. mungi*. Geneticamente, todos os membros deste complexo são bastante semelhantes tendo cerca de 99,9% de semelhança nucleotídica e sequências do rRNA 16S idênticas (Cousins, 2003).

O *M. tuberculosis* é o principal responsável pela TB e encontra-se espalhado por todo o mundo. Vários estudos têm demonstrado que as linhagens de *M. tuberculosis* estão fortemente associadas com as regiões geográficas. A filogenia global da estirpe indica que as linhagens se têm adaptado às características populacionais, daí existirem linhagens específicas ou muito mais prevalentes em determinadas zonas geográficas (Caws et al., 2008).

O *M. africanum* tem uma elevada incidência nos países da África Ocidental, sendo a Guiné-Bissau o país mais afectado, em que 52% dos casos de TB são causados por *M. africanum*, seguido da Gâmbia (38%) e da Serra Leoa (24%) (De Jong et al., 2010). O *M. africanum* produz resultados variáveis na caracterização bioquímica clássica, o que dificultou a sua classificação em (sub)-espécies. Através da caracterização bioquímica é possível distinguir o *M. africanum* do tipo I (Oeste Africano) e do tipo II (Leste Africano). Com técnicas de genotipagem molecular o *M. africanum* tipo I foi subdividido em *M. africanum* tipo I ou Africano 1 West, prevalente em todo o Golfo da Guiné, e em *M. africanum* tipo II ou Africano 2 West, predominante no oeste da África Ocidental (De Jong et al., 2010).

O *M. bovis* é mais prevalente em bovinos e outros animais como alces e veados. No ser humano afecta principalmente os pulmões e os nódulos linfáticos. É quase indistinguível da TB causada por *M. tuberculosis* e ocorre principalmente em indivíduos que manipulam e bebem leite contaminado. Os trabalhadores agrícolas podem adquirir a doença pela inalação dos bacilos provenientes da tosse de bovinos infectados. Em regiões onde a TB bovina tem sido combatida, ocorrem alguns casos

residuais entre idosos devido à reactivação de lesões latentes (Hardie et al., 1992; O'Reilly et al., 1995). Os casos de TB por *M. bovis* representam menos de 1% de todos casos de TB.

O *M. microti* causa TB nos roedores de pequeno porte. Esta espécie tem um crescimento lento, daí a dificuldade no seu isolamento e diferenciação. Com técnicas moleculares é possível a sua detecção e tipagem precisas. Em estudos retrospectivos a espécie foi detectada em cerca de sete indivíduos do sexo masculino de diferentes zonas geográficas em que um dos indivíduos era imunocompetente, outro possuía VIH e em dois deles a bactéria estava na causa de TB pulmonar (Brodin et al., 2002; Emmanuel et al., 2007).

O *M. canettii* surgiu pela detecção, num paciente com linfadenite, de bacilos que originavam culturas de colónias suaves e brilhantes (características do *Mycobacterium*). Na rotina laboratorial pode ser desvalorizado devido à sua semelhança com o *M. tuberculosis*. Os casos conhecidos de infecção por *M. canettii* são mais prevalentes em África (Surname et al., 2008).

A estirpe *M. caprae* foi identificada pela primeira vez em tecido infectado de cabra, daí o nome atribuído. Esta espécie é sensível à pirazinamida e geneticamente apresenta uma combinação de polimorfismos específicos. No gene *gyrB* foi detectada a substituição de nucleótidos específicos, não existentes em outras espécies (Aranaz et al., 1999; Aranaz et al., 2003).

O *M. pinippedii* foi detectado em amostras de tecidos infectados de pinípedes (focas, leões-marinhos e morsas). Existiram algumas dúvidas quanto à sua classificação, no entanto o perfil obtido da análise proteica e dos fragmentos de DNA, indicaram que esta espécie representa um clade isolado. Dados filogenéticos e propriedades bioquímicas confirmaram que a espécie pertence ao CMT (Cousins et al., 2003; Cousins et al., 1993).

O *M. suricatta* causa TB nos suricatas, foi relatado pela primeira vez em 2002 e isolado na África do sul. Anteriormente as estirpes encontradas nestes animais eram definidas como *M. tuberculosis*, *M. bovis* e como um membro do CMT adaptado ao animal. A ocorrência de TB causou preocupações sobre o risco de infecção para outros animais selvagens, animais domésticos e seres humanos (Parsons et al., 2013).

O *M. orygis* foi encontrado em antílopes e o primeiro isolado desta espécie foi detectado no órix, em 2012. Causa TB também em seres humanos, tendo uma maior incidência na África e no sul da Ásia (van Ingen et al., 2012; Gey van Pittius, 2012).

O *M. mungi* foi isolado em mangustos (*Mungos mungo*) que viviam perto de populações humanas em Botswana. Esta espécie provoca elevadas taxas de mortalidade entre os mangustos que vivem perto dos humanos (Alexander et al., 2010).

1.7 TUBERCULOSE

1.7.1 INFECÇÃO E MODO DE TRANSMISSÃO

O *M. tuberculosis* é transportado em partículas com 2 a 3 bacilos provenientes de pessoas com TB pulmonar ou laríngea, através de tosse, espirro ou da própria fala. Após inalação, as partículas dirigem-se para os alvéolos pulmonares onde o *M. tuberculosis* infecta os macrófagos alveolares, que asseguram a disseminação através de barreiras anatómicas, começando pelo epitélio respiratório. A expressão de certos genes nos macrófagos alveolares confere à micobactéria uma maior probabilidade de multiplicação e de virulência, motivo pelo qual estas células são os seus alvos preferenciais. O facto do tempo de vida dos macrófagos alveolares ser mais longo possibilita a multiplicação inicial do número de bacilos (Ahmad., 2011; Forrellad et al., 2013).

O *M. tuberculosis* utiliza diversos receptores do complemento (CR) como portas de entrada para o meio intramacrofágico, principalmente através da activação do receptor C3 (CR3). A sua ligação ao CR3 inibe a produção de IL-12 pelos macrófagos, beneficiando a sobrevivência do *M. tuberculosis*. Isto acontece porque, a IL-12 é uma interleucina que favorece a resposta dos linfócitos T CD4⁺, logo, não existindo a sua produção também não existe uma resposta imunológica adequada por parte dos macrófagos (Ahmad, 2011; Forrellad et al., 2013; Guirado et al., 2013). Outra particularidade consiste no facto de a expressão de CR4 aumentar com a diferenciação de monócitos para macrófagos, existindo um aumento acentuado do número de macrófagos alveolares. Este facto permite explicar o porquê de a fagocitose de *M. tuberculosis* por macrófagos alveolares superar a de monócitos (Ahmad, 2011; Forrellad et al., 2013; Guirado et al., 2013).

Após a fagocitose o macrófago liberta citocinas (glicoproteínas que induzem a produção de anticorpos), uma delas é o factor de necrose tumoral-alfa (TNF- α) que actua sobre os macrófagos, induzindo os intermediários reactivos de nitrogénio (RNIs), que são bastante eficazes contra as micobactérias virulentas. Outra citocina produzida pelas células imunitárias em resposta à presença da bactéria é o IFN- γ .

A micobactéria sobrevive no fagossoma do macrófago durante vários dias se, o lisossoma não se fundir com o fagossoma e se não houver acidificação do meio intrafagossômico. (Ahmad, 2011; Forrellad et al., 2013; Guirado et al., 2013)

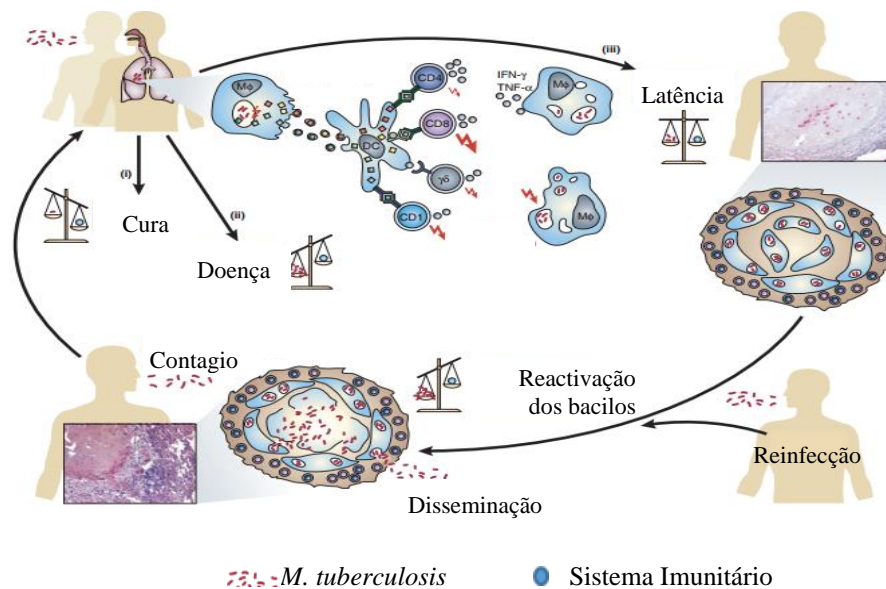


Figura 4 - Processo de Infecção pelo *M. tuberculosis*. Quando o bacilo infecta o homem podem ocorrer três situações distintas: i) O sistema imunitário consegue combater a infecção; ii) A infecção evolui para TB por deficiência do sistema imunitário, o que acontece com frequência nos indivíduos com VIH; iii) Após inalação o *M. tuberculosis* é fagocitado pelos macrófagos alveolares, que permitem a transferência de antígenos para as células dendríticas. E assim ocorre estimulação das células T CD4⁺, T CD8⁺, T γδ e T CD1. A libertação de IFN-γ e TNF-α vai activar outros macrófagos e promover a resposta imunológica. DC: célula dendríticas; Mφ: macrófago infectado (adaptado de Kaufmann et al., 2005).

A disseminação da doença é acompanhada de proliferação bacteriana até que, passadas duas a dez semanas, uma resposta imunitária competente trava o processo descrito ou, em casos de susceptibilidade, a doença instala-se (Figura 4). Alguns dos bacilos podem ficar quiescentes mas viáveis durante um número indeterminado de meses ou anos. A este estado de contenção da multiplicação bacilar designa-se por TB latente e não é infeccioso (Ahmad, 2011; Barrios-payán et al., 2010). A patologia causa diversos sintomas como astenia, tosse e emagrecimento (Barrios-payán et al., 2010; Burdass, 2009).

A predisposição para TB é mais elevada em indivíduos com o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) devido à diminuição do sistema imunitário. O VIH altera funcionalmente os monócitos e macrófagos, por diminuição da capacidade dos linfócitos $CD4^{+}$, ficando desta forma comprometida a resposta inicial ao *M. tuberculosis* (Ahmad, 2011; Talip et al., 2013). Nestes indivíduos a TB tem uma progressão mais rápida e a reactivação é mais frequente assim como a reinfeção. Contudo não é só o VIH que influencia o curso da TB, o contrário também acontece. A TB promove a libertação de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$ pelos macrófagos, o que acelera a replicação do VIH e a progressão da infecção (Ahmad, 2011).

A TB pulmonar varia desde formas assintomáticas a formas mais graves resultantes da disseminação. A TB pulmonar é diferenciada em primária ou secundária. A TB primária é diagnosticada e desenvolvida nos primeiros cinco anos após a infecção enquanto a TB secundária desenvolve-se após os primeiros cinco anos a seguir à infecção primária (Burdas, 2009; Bombarda et al., 2001)

Apesar de a TB se instalar principalmente nos pulmões, a doença não é exclusivamente pulmonar. Alguns exemplos de TB extrapulmonar são a TB do aparelho locomotor, ocular ou das glândulas supra-renais. (Bolognesi et al., 2013; Santos et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Basu et al., 2014).

1.8 TUBERCULOSE RESISTENTE

O aparecimento de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes aos antibacilares é apontado, conjuntamente com a pandemia de VIH, como uma das principais razões para a reemergência da TB na década de 1980, o que levou a OMS a decretar esta doença como uma emergência global em 1993 (Müller et al., 2013).

Os pacientes com TB resistente são classificados como tendo resistência adquirida ou primária, de acordo com a existência de tratamentos anteriores. A OMS definiu que existe resistência adquirida quando é isolado *M. tuberculosis* resistente em indivíduos que já foram tratados para a TB, e resistência primária quando são isolados bacilos resistentes em pacientes sem um historial de tratamentos anteriores (WHO, 2014).

A OMS, para uniformizar e para facilitar a compreensão de taxas de resistência atribuiu as seguintes definições:

- Monorresistência: caracteriza uma estirpe que é resistente a um dos antibacilares de primeira linha (WHO, 2010a).
- Polirresistência: significa resistência a mais do que um dos antibacilares de primeira linha (WHO, 2010a).
- TB Multirresistente (TB-MR): resistência simultânea à isoniazida e rifampicina, a que se podem associar resistências a outros fármacos antibacilares (WHO, 2010b).
- TB extensivamente resistente (TB-XDR): TB com resistência à isoniazida e rifampicina (TB-MR), a qualquer fluoroquinolona (ciprofloxacina ou ofloxacina) e a um agente injectável de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) (WHO, 2010b).

Hoje em dia fala-se de uma TB totalmente resistente, embora ainda não exista consenso na sua definição.

Em 2012, praticamente todos os países do mundo reportaram casos de multirresistência, independentemente da sua condição económica. O número de casos notificados de TB-MR é menor na Europa Ocidental e Central; e América do Norte, seguidos da África e América do Sul. A Europa de Leste apresenta o maior número de casos reportados de TB-MR (WHO, 2014a).

Em 2013, foram detectados 480 000 novos casos de TB-MR por todo o mundo (WHO, 2014a). No mesmo período, na Guiné-Bissau foram notificados 37 novos casos de TB-MR (WHO, 2014c) e em Portugal foram notificados 14 (1,5%) novos casos de TB-MR (CDEC, 2015).

O principal mecanismo de resistência consiste na aquisição de mutações em genes que estão directamente relacionados com o processamento dos antibacilares, conferindo resistência aos mesmos (Müller et al., 2013). Outros mecanismos de resistência estão relacionados com a estrutura da parede celular. Esta contém lípidos complexos associados ao ácido micólico, que conferem impermeabilidade à entrada dos antibacilares com actividade citoplasmática (Buriánková et al., 2004; Bosne-David, 2000). Paralelamente, o *M. tuberculosis* tem vários transportadores proteicos transmembranares que podem excretar os antibacilares do interior do bacilo, impedindo a sua acção (Louw, 2009). Adicionalmente, o bacilo da TB produz beta-lactamases, tornando-o resistente aos antibióticos beta-lactamicos (Kwon et al., 1995).

Durante a infecção, o *M. tuberculosis* pode encontrar-se em compartimentos específicos (granulomas), onde o oxigénio e os nutrientes são reduzidos. Para sobreviver, o bacilo entra num estado de dormência em que cessa a divisão e reduz o metabolismo, o que lhe confere uma resistência temporária a certos antibacilares (Gomez et al., 2004). Este fenómeno é distinto da resistência adquirida pois não está associado a alterações genéticas e o organismo torna-se susceptível quando se volta a dividir. A duração prolongada do tratamento pode dever-se à dificuldade na eliminação dos bacilos latentes, que desenvolvem tolerância aos antibacilares, particularmente à isoniazida (Karakousis et al., 2008; Vilchère et al., 2006).

1.9 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

O diagnóstico microbiológico da TB, após a correcta colheita da amostra clínica (expectoração), inicia-se com microscopia e eventual amplificação directa de ácidos nucleicos, seguida de cultura e identificação da mesma.

A microscopia permite avaliar se o bacilo é álcool ácido resistente e pode ser realizada pela coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) ou pela coloração com auramina ou rodamina. A baciloscopia pela coloração de ZN de esfregaços de amostras clínicas permite a detecção de micobactérias. Este método apresenta uma baixa sensibilidade pois requer uma amostra com elevado número de bacilos, o que o torna inadequado para casos paucibacilares como por exemplo casos de TB extra-pulmonar (Rastogi et al., 2001). Em 2009, a OMS recomendou a microscopia LED (microscopia fluorescente de díodo emissor de luz) como uma alternativa para a microscopia por ZN. Este método é mais sensível que a microscopia convencional. Globalmente, a mudança para microscópios de LED tem sido gradual (WHO, 2014a).

A amplificação directa a partir da amostra clínica descontaminada é realizada em sistemas automatizados através da amplificação do DNA ou RNA. Os exemplos mais utilizados são o Amplicor (*Roche*, Suíça) que amplifica o DNA e permite detectar *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. intracellulare* com obtenção de resultados no próprio dia (Soini et al., 2001); o sistema Artus (*Qiagen*, Holanda) detecta estirpes do CMT também através da amplificação do DNA e após uma hora é possível obter resultados (Hur et al., 2011); o sistema E-MTD (*GenProbe*, California, USA) permite a detecção do complexo CMT por amplificação do RNA, permitindo obter resultados em duas a três horas (Soini et al., 2001); outro sistema de detecção automática por amplificação do RNA é o Genotype Mycobacteria Direct (*Hain lifescience*, Alemanha) que permite a detecção de cinco espécies de micobactérias clinicamente relevantes e o resultado é obtido em poucas horas (Neonakis, 2009); finalmente o sistema GeneXpert MTB / RIF (*Cepheid*, California, USA), que funciona por PCR em tempo real, é específico para *M. tuberculosis* e permite obter resultados em duas a três horas. Este último sistema permite ainda a detecção de mutações relacionadas com a resistência à rifampicina. Vários estudos demonstraram uma sensibilidade de 90 – 99% para este sistema (Steingart et al., 2014; Van Deun et al., 2013; Zetola et al., 2014; Zwerling et al., 2014).

O exame cultural é o pilar do diagnóstico da TB, sendo bastante sensível e específico, contudo é um método demorado (Guillet-Caruba et al., 2014). Os meios sólidos onde se realiza a cultura são o de Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H11. O crescimento visível de *M. tuberculosis* pode levar cerca de 3 a 8 semanas (Abe, 2003).

A combinação dos meios líquidos com indicadores de crescimento permitiu desenvolver sistemas de detecção automáticos que visam um crescimento e detecção mais rápidos de *M. tuberculosis* (Ardito et al., 2001; Bemer et al., 2002). O sistema automatizado mais utilizado é o BACTEC® MGIT® 960, existindo outros como o Versa TREK (Bio-Mérieux, França). O BACTEC® MGIT® 960 utiliza o meio de cultura líquido Middlebrook em tubos que contêm um composto fluorescente fixo ao silicone da base. A fluorescência é libertada quando o oxigénio é consumido pelas micobactérias e detectada por exposição do tubo à luz ultravioleta (Scarpato et al., 2001). Este sistema permite uma incubação e monitorização contínua do aumento da emissão de fluorescência, demorando entre 7 a 12 dias. Este sistema tem-se revelado útil também para a realização dos testes de susceptibilidade aos antibacteriais. O sistema Versa TREK detecta as micobactérias pela diminuição da pressão devido ao consumo do oxigénio. A principal vantagem deste método é que permite detectar micobactérias em qualquer amostra clínica, incluindo sangue e urina (Mirrett et al., 2007).

No caso de um teste cultural positivo é necessário proceder à identificação da espécie micobacteriana através de sondas de identificação. São utilizados métodos automatizados que permitem não só a identificação de estirpes do CMT como também de outras micobactérias. Como exemplos, o sistema AccuProbe (Hologic, US) permite a detecção de estirpes do CMT, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* e *M. kansasii*; o sistema MGIT TBc Identification test (Becton Dickinson, US) apenas identifica estirpes específicas para o CMT, assim como o Genotype MTBC (Hain, Lifescience, Alemanha) (Machado et al., 2014; Richter et al., 2003); outro sistema é o INNO-LiPA (Innogenetics, Bélgica) que permite a identificação do género *Mycobacterium* e 16 espécies micobacterianas; e ainda o Genotype CM (Hain Lifescience, Alemanha) que também permite a detecção do CMT e de 13 micobactérias não tuberculosas (Borstel et al., 2005).

Para testes de identificação com resultado positivo deverão ser realizados testes de susceptibilidade aos antibacilares que podem igualmente ser realizados usando sistemas automatizados de cultura em meio líquido como o Bactec MGIT 960 (antibacilares de primeira e segunda linha) e/ou o Versa TREK (rifampicina, isoniazida, etambutol e piraminazida).

Alguns testes moleculares permitem, para além da identificação de *M. tuberculosis*, a detecção de resistências. O INNO-LiPA RIF.TB (*Innogenetics*, Belgica) baseado em hibridação reversa, permite também a detecção de mutações que caracterizam a resistência à rifampicina (numa região do gene *rpoB*) (Viveiros et al., 2005). O MTBDRplus (*Hain Lifescience*, Alemanha) também se baseia na técnica de hibridação reversa e permite a identificação de mutações em genes associados à resistência à rifampicina e/ou à isoniazina (Lacoma et al., 2008; Dorman et al., 2012; Barnard et al., 2012). Baseado no mesmo princípio, o sistema Genotype® MTBDRsl (*Hain Lifescience*, Alemanha) permite a detecção de estirpes resistentes ao etambutol, às fluoroquinolonas e a antibacilares injectáveis de segunda (amicacina, canamicina e capreomicina) (Theron et al., 2014).

1.10 TRATAMENTO

A taxa de cura da TB é de 95% nos casos que não apresentem complicações. Para que o tratamento seja eficaz é necessário que o diagnóstico seja preciso, assim como a determinação da resistência aos fármacos. A sua administração deve ser realizada em regimes eficazes e controlados (Zumla et al., 2015).

O tratamento da TB assenta principalmente na utilização de fármacos de primeira linha por terem uma maior eficácia e baixos níveis de toxicidade para o homem. Este grupo é composto por cinco antibacilares: estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazinamida. A rifampicina é o único antibacilar de primeira linha com alguma eficácia contra as micobactérias latentes. A isoniazida tem uma concentração mínima inibitória bastante reduzida, daí a sua extrema eficácia no tratamento. A pirazinamida é importante no tratamento de curta duração em combinação com a isoniazida e a rifampicina (Geetha et al., 2012).

Quando os antibacilares de primeira linha não são eficazes no tratamento da TB recorre-se aos fármacos de segunda linha. Quando comparados com os de primeira linha são menos eficazes e mais tóxicos. Alguns dos antibacilares que fazem parte deste grupo são a ofloxacina, capreomicina, amicacina, rifabutina, etionamida, ácido para-aminossalicílico, linezolid e moxifloxacina (Shim et al., 2013; WHO, 2014a).

Actualmente, o regime de tratamento de curta duração é o regime padrão definido pela OMS, com a duração de seis meses e divide-se em duas fases. A primeira fase ou fase intensiva dura dois meses e consiste na administração de isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol. A segunda fase ou fase de continuação dura quatro meses e são administrados isoniazida e rifampicina. Este regime é recomendado para pacientes sem suspeita de TB-MR, embora o etambutol deva ser mantido durante toda a fase, em locais com elevadas taxas de resistência aos antibacilares de primeira linha, ou seja, resistência a fármacos que não tenha resultado de um tratamento anterior (WHO, 2014a). Em caso de a doença já se ter disseminado, de imunossupressão ou de a cultura continuar positiva ao fim de oito semanas, a terapia dos seis meses não é suficiente e o tratamento é prolongado até aos nove meses (Zumla et al., 2015).

No tratamento da TB-MR são utilizados antibacilares mais caros e mais tóxicos, os antibacilares de segunda linha. O regime de tratamento recomendado pela OMS encontra-se esquematizado na Tabela 1 (WHO, 2014a).

Tabela 1 - Orientações para o tratamento de TB-MR (adaptado de WHO, 2014a).

Teste de sensibilidade aos antibacilares	Fase inicial		Fase de continuação	
	Antibacilares	Duração (meses)	Antibacilares	Duração (meses)
Não aplicável ^a	Canamicina Etionamida Fluoroquinolonas ^b Pirazinamida +/- Etambutol	≥ 6	Etionamida Fluoroquinolonas ^b Pirazinamida +/- Etambutol	12-18
Resistência à: Isoniazida + rifampicina	Estreptomicina Etionamida Fluoroquinolonas ^b Pirazinamida +/- Etambutol	≥ 6	Etionamida Fluoroquinolonas ^b Pirazinamida +/- Etambutol	12-18
Resistência a todos os antibacilares de 1 ^a linha	1 antibacilar injectável 1 Fluoroquinolona ^b Utilizar dois de: PAS ^c , etionamida ou cicloserina	≥ 6	Todos excepto os antibacilares injectáveis	18
Teste de sensibilidade aos antibacilares de 2 ^a linha	Regime individualizado consoante o padrão de sensibilidade			

^a O uso do regime standardizado pode ser exequível num país com recursos limitados e alta incidência de TB.

^b ciprofloxacina ou ofloxacina

^c ácido para-aminosalicílico

1.11 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A epidemiologia molecular surgiu em grande parte devido à integração da biologia molecular, medicina clínica, estatística e epidemiologia. Esta abrangente área estuda o papel dos factores genéticos e ambientais tanto ao nível molecular como a nível celular ou bioquímico, tendo em conta a etiologia da doença e a sua distribuição geográfica. Mais especificamente a epidemiologia molecular tenta utilizar uma abordagem multidisciplinar para identificar os factores que determinam a causa da doença, a sua propagação e distribuição no espaço e no tempo (Mathema et al., 2006; Barnes et al., 2007). Os estudos epidemiológicos são realizados pela associação das características epidemiológicas com as propriedades biológicas de isolados clínicos de indivíduos sintomáticos. A sua utilização é vastíssima e estão constantemente a ser descobertas novas formas de a aplicar. Antes de existirem métodos moleculares, não era possível entender a propagação exacta da TB. Neste sentido a epidemiologia molecular tem sido muito aplicada a estudos populacionais, permitindo estabelecer ligações epidemiológicas entre doentes que, de outra maneira, nunca seriam relacionados. Os estudos de epidemiologia molecular mostram que a transmissão da TB varia localmente. Locais onde não existem condições higieno-sanitárias são muitas vezes os focos de transmissão da TB. Os serviços de cuidados de saúde, bares e transportes públicos têm sido também importantes locais de transmissão da TB. Os esforços para identificar populações de alto risco e locais de transmissão são cruciais para o efectivo controlo da doença (Zamudio et al., 2015; Ma et al., 2015; Lonnroth et al., 2015).

A multiplicidade de ferramentas moleculares disponíveis é fundamental para escolher o método epidemiológico adequado para tratar de uma questão em particular (transmissão, surtos ou filogenia). Em geral, os aspectos-chave na escolha da abordagem molecular adequada para estudos epidemiológicos, são a taxa de polimorfismos e a diversidade genética das estirpes. Estes, juntamente com a prevalência geral da TB, devem ser levados em consideração na escolha do método epidemiológico e na avaliação de dados (Mathema et al., 2006).

Durante quase duas décadas a técnica *gold-standard* de genotipagem era baseada na detecção da sequência de inserção IS6110 (presente apenas em estirpes do CMT e cujo seu número de cópias varia entre 1 e 20 por cromossoma) por RFLP

(*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A técnica tem um elevado poder discriminatório mas apresenta algumas desvantagens pois requer uma quantidade de DNA considerável, apenas possível de obter através da cultura. Estirpes diferentes apresentam uma grande variabilidade, quer no número de cópias quer na sua localização. As limitações da técnica foram ultrapassadas pelas técnicas de *Spacer Oligonucleotide Typing* (Spoligotyping) e *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats* (MIRU-VNTR) (Barnes et al., 2007; Mathema et al., 2006).

A genotipagem por MIRU-VNTR baseia-se na amplificação por PCR das regiões intergénicas de repetições nucleotídicas com um número variável em tandem (VNTR) com 40 a 100 pb, designadas por MIRUs (Figura 5). Na técnica são amplificados 12, 15 ou 24 *loci* e cada um é caracterizado pelo número de repetições, gerando um código numérico (Barnes et al., 2007). As técnicas MIRU-VNTR 15 *loci* e 24 *loci* possuem maior poder discriminatório que o MIRU-VNTR 12 *loci* pois englobam mais regiões de estudo, aumentando assim a especificidade. O MIRU-VNTR 15 *loci* foi proposto como a técnica *standard* para discriminação epidemiológica de isolados *M. tuberculosis* e o MIRU-VNTR 24 *loci* é avaliado como sendo o sistema de alta resolução para estudos filogenéticos uma vez que, permite uma discriminação mais precisa entre isolados da mesma espécie (Mathema et al., 2006). A metodologia MIRU-VNTR permite a catalogação digital dos resultados, facilitando a comparação inter-laboratorial de perfis (Barnes et al., 2007; Supply et al., 2006). A técnica pode ser realizada de forma automatizada pela utilização de *primers* marcados com fluorocromos, permitindo a genotipagem de um elevado número de isolados em menos tempo (Supply et al., 2006).

A técnica de Spoligotyping analisa o *locus* DR (*direct repeat*) existente no cromossoma de *M. tuberculosis* com 10 a 50 cópias de 36 pb separadas por espaçadores com sequências diferentes (Figura 5). As regiões DR podem perder irreversivelmente espaçadores devido à recombinação homóloga ou à transposição do IS6110, não sendo possível obter fragmentos de DNA adicionais. A variabilidade existente na ausência ou presença de espaçadores específicos e o padrão de espaçadores num isolado particular pode ser usado na sua genotipagem. O método Spoligotyping é baseado na amplificação por PCR das regiões espaçadoras no *locus*

DR e detecção por hibridação reversa utilizando sondas específicas. Dada a unidireccionalidade evolutiva deste tipo de marcador, deleções de DRs e de espaçadores podem ocorrer várias vezes e de forma independente levando a uma evolução convergente (Mathema et al., 2006). Comparativamente com a genotipagem por RFLP-IS6110 este método tem a vantagem de necessitar de pequenas quantidades de DNA, e os resultados, positivo ou negativo, podem ser expressos em formato numérico, o que à semelhança do MIRU-VNTR facilita a comparação inter-laboratorial de perfis (Barnes et al., 2007). Esta comparação é possível através da base de dados SITVIT WEB (www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE) que nos permite ter acesso à linhagem de cada isolado assim como ao SIT (*Spoligotyping International Type*). O SIT indica que o perfil de Spoligotyping em estudo já foi identificado em dois ou mais isolados clínicos, no caso de apenas ter sido isolado uma vez este é designado por *Orphan* (Demay et al., 2012).

Através da técnica de Spoligotyping é possível reconhecer as estirpes *M. africanum* pela ausência dos espaçadores nove a 39 no seu perfil de Spoligotyping (Huard et al., 2006). Dados prévios sugerem que algumas, mas não todas, as estirpes AFRI_1 têm deleção do espaçador número oito em adição às deleções nos espaçadores nove e 39. Estirpes AFRI_2 apresentam deleção dos espaçadores sete a nove e 39 (Vasconcellos et al., 2010).

Comparando a técnica de Spoligotyping com a de MIRU-VNTR verifica-se que a técnica MIRU-VNTR tem maior poder de discriminação, principalmente quando utilizados os 24 loci. Contudo a técnica de Spoligotyping permite caracterizar as estirpes num contexto macroepidemiológico.

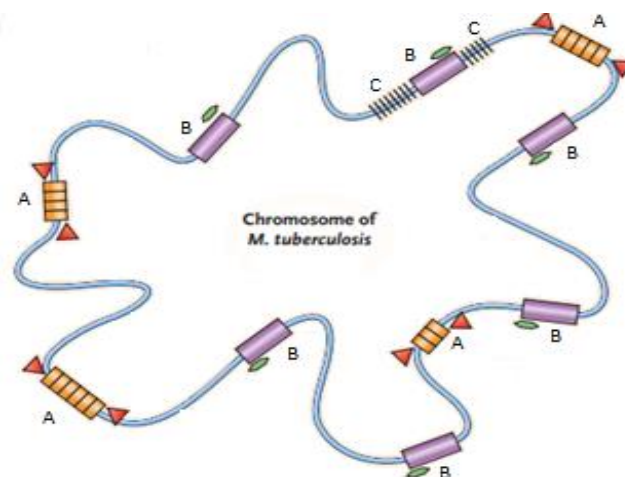


Figura 5 - Genoma do *M. tuberculosis*. A - MIRUs; B – IS6110; C- Locus Direct Repeats (Adaptado de Barnes et al., 2007).

Em Portugal, nas duas últimas décadas, a TB-MR e a TB-XDR têm estado altamente associadas com uma família de estirpes geneticamente muito semelhantes, designada por família Lisboa (Perdigão et al., 2013). A família Lisboa foi definida como um grupo de estirpes que partilham um perfil de RFLP-IS6110 semelhante de nove a 11 bandas (pertencente à linhagem LAM) e/ou partilha de uma taxa de similaridade de pelo menos 95% quando genotipadas por MIRU-VNTR 12 loci. A prevalência dessa família na região de Lisboa pode representar até 74% e 80% dos casos de TB-MR e TB-XDR, respectivamente. Outro *cluster* fortemente relacionado com a resistência na região pertence à linhagem LAM e é designado por Q1. Este *cluster* é geneticamente muito próximo da família Lisboa, provavelmente com uma origem comum. Quando genotipadas por MIRU-VNTR 12 loci, as estirpes Q1 têm sido idênticas ao *cluster* Lisboa 3, para 11 loci MIRU-VNTR. Porém, quando genotipadas por Spoligotyping, apresentam perfis mutacionais distintos, devido à supressão dos espaçadores 38-43 no locus DR (Perdigão et al., 2013).

Em vários estudos epidemiológicos do CMT na Guiné-Bissau foi identificado um grupo único de espécies designadas por Família Guiné-Bissau. As estirpes desta família apresentam um perfil de Spoligotyping AFRI-1 mas por RFLP-IS6110 apresentam um perfil distinto, tendo poucas inserções IS6110 e não contêm as regiões de diferença RD7, RD8, RD9, e RD10, RD701 e RD702 (Groenheit et al., 2011). Apesar de serem genotipicamente próximas, são bastante heterogêneas fenotipicamente (p.e. na resistência à pirazinamida) (Kallenius et al., 1999).

A estirpe de *M. tuberculosis* H37Rv (estirpe virulenta), é a estirpe mais utilizada na investigação e como referência laboratorial, foi a primeira cujo genoma foi sequenciado. O seu genoma completo e as informações sobre a espécie foram publicadas em 1998 por Cole et al (Cole et al., 1998). Mais recentemente, o desenvolvimento e difusão de tecnologias de sequenciação de nova geração tem permitido a sequenciação genómica de um número cada vez maior de isolados clínicos num período temporal cada vez menor. Trata-se de uma metodologia passível de ser implementada com várias finalidades, incluindo a genotipagem. Este método potencialmente permite identificar todas as diferenças existentes a nível nucleotídico entre dois isolados, exibindo um maior poder discriminatório quando comparado com os métodos de tipagem clássicos (RFLP-IS6110, Spoligotyping e MIRU-VNTR) (Perdigão et al., 2014). Permite ainda identificar surtos de TB e avaliar a direcção da transmissão entre indivíduos. Walker *et al.* (2013) definiram um limiar de 12 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) de diferença, acima do qual a transmissão recente é excluída (Walker et al., 2013). A técnica é também utilizada para a discriminação de isolados de *M. tuberculosis* dentro de *clusters* MIRU-VNTR (Perdigão et al., 2014). A vigilância de rotina por sequenciação ainda está longe mas, espera-se um maior entendimento da transmissão da doença, à medida que mais estirpes são sequenciadas e que os dados produzidos são analisados à luz da informação clínica e epidemiológica tradicional (Perdigão et al., 2014).

1.12 OBJECTIVOS

O trabalho desenvolvido compreende a análise genotípica de isolados clínicos oriundos da Guiné-Bissau e da Região de Saúde de Lisboa com tuberculose. Os objectivos deste trabalho são:

1. Caracterizar e identificar estirpes de *M. tuberculosis* responsáveis por casos de TB na Guiné-Bissau;
2. Posicionar, num contexto macroepidemiológico, as estirpes identificadas;
3. Comparar estirpes provenientes da Guiné-Bissau, com estirpes circulantes na Região de Saúde de Lisboa, incluindo a comparação com estirpes de indivíduos de nacionalidade guineense (Guiné-Bissau).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ISOLADOS CLÍNICOS

Neste estudo foram utilizados um total de 53 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, correspondendo cada isolado a um doente com tuberculose:

- 13 Isolados enviados pelo laboratório de micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), oriundos do Hospital Raoul Follereau, Guiné-Bissau, em 2012, de pacientes guineenses com diagnóstico clínico de TB e baciloscopia positiva aos dois meses de tratamento;
- 9 Isolados clínicos provenientes da Região de Saúde de Lisboa, enviados pelo IHMT entre 2003 e 2008;
- 6 Isolados clínicos provenientes da Região de Saúde de Lisboa, enviados pelo Hospital Curry Cabral entre 2013 e 2014;
- 25 Isolados clínicos provenientes de doentes da Região da Saúde de Lisboa com nacionalidade guineense, enviados pelo Laboratório de Saúde Pública da Administração Regional de Saúde de Lisboa (ARS) entre 2007 e 2008.

As amostras enviadas consistiram em DNA extraído nos laboratórios de micobacteriologia do IHM (método CTAB) ou ARS (Termólise), excepto para os isolados clínicos provenientes do Hospital Curry Cabral, cuja amostra enviada consistiu na cultura e o DNA foi extraído no Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Farmácia no decorrer do presente trabalho. Os dados fenotípicos dos isolados (antibiogramas e identificação) e dados demográficos dos respectivos doentes foram fornecidos pelos respectivos laboratórios de origem.

2.2 EXTRACÇÃO DE DNA

O procedimento utilizado para extrair e purificar DNA de *M. tuberculosis* no decorrer do presente estudo consistiu no método de CTAB, previamente descrito por Van Soolingen *et al.* (van Soolingen et al., 2001). Duas ansas de cultura no meio Lowenstein-Jensen dos isolados em estudo foram inicialmente ressuspendidas em 400 µl de tampão, 80°C durante 20 minutos, de forma a inactivar a cultura. Após arrefecimento da suspensão, foram adicionados 50 µl de lisozima (10 mg/ml) seguido de incubação *overnight* a 37°C. De seguida, adicionaram-se 75 µl da solução SDS/proteinase K (ver Anexo 3) e incubou-se 10 minutos a 65°C. Seguidamente, foram adicionados 750 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitou-se vigorosamente (vortex) e centrifugou-se durante 8 minutos a 15 700 rcf. Transferiu-se a fase aquosa (superior) para um novo tubo ao qual adicionou-se 450 µl de isopropanol para precipitação do DNA. Colocou-se o tubo a – 20°C durante pelo menos 60 minutos e de seguida centrifugou-se a 15 700 rcf durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, ficando cerca de 20 µl, adicionou-se 1 ml de etanol frio a 70% e inverteu-se o tubo algumas vezes de modo a lavar o DNA precipitado (remoção de iões). O sobrenadante foi descartado ficando cerca de 20 µl no tubo, centrifugou-se durante 1 minuto a 15 700 rcf. Todo o sobrenadante foi removido cuidadosamente. O *pellet* foi deixado a secar durante aproximadamente 15 minutos à temperatura ambiente de modo a evaporar todo o etanol. Dissolveu-se o *pellet* em cerca de 70 µl de tampão a 1X e deixou-se a 4°C *overnight*.

Após a extracção, o DNA foi quantificado por espectrofotometria num aparelho *NanoDrop* (*NanoDrop, Thermo Scientific, USA*) e diluído para 5 ng/µl e 25 ng/µl para posterior utilização.

2.3 GENOTIPAGEM POR MIRU-VNTR

A genotipagem por MIRU-VNTR foi realizada para cada isolado através de amplificação por PCR *multiplex* de 24 *loci*, usando a polimerase de DNA HotStarTaq (Qiagen®, US), como já descrito por Supply *et al.* (2001). A convenção MIRU-VNTR encontra-se no Anexo 1.

2.3.1 MISTURAS DE REACÇÃO

As misturas de reacção de PCR devem ser preparadas no momento em que são utilizadas, antes da adição do DNA genómico. No entanto, existem soluções que necessitam de preparação (como a diluição dos dNTP), estas podem ser preparadas antecipadamente e armazenadas a -20°C até à sua utilização. O volume final por reacção (após a adição de DNA) foi de 20 µl (Tabela 2 e Tabela 3).

Tabela 2 - Volume de cada componente para preparação das misturas de PCR *multiplex*.

Misturas de reacção	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Loci</i>	4	10	0424	2401	2163b	2	20	2347
	26	16	0577	3690	1955	23	24	2461
	40	31	2165	4156	4052	39	27	3171
Água bidestilada estéril (µl)	7	8,3	8,7	7,5	8,7	7,9	8,7	8,3
Tampão 10x (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2
Solução Q (µl)	4	4	4	4	4	4	4	4
MgCl ₂ 25mM (µl)	1,2	0,4	0	1,2	0	0,8	0	0,4
dNTP 5mM	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
<i>Primers</i> (cada, µl)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
DNA polimerase (µl)	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
DNA (µl) 5ng/ µl	2	2	2	2	2	2	2	2
Total (µl)	20	20	20	20	20	20	20	20

*A concentração dos *primers* não marcados é de 20 pmol/µl. Nos *primers* marcados a concentração é de 2 pmol/µl para o *locus* 0577, 3690 e 1955; 8 pmol/µl para o *locus* 4052; 20 pmol/µ para o *locus* 4156 e 4 pmol/µl para os restantes *loci*.

2.3.2 AMPLIFICAÇÃO

A amplificação dos *loci* alvo foi realizada por PCR de acordo com as condições descritas na Tabela 3, num termociclador T3 Thermocycler (*Biometra® Goettingen, Germany*). O número de ciclos do programa de amplificação foi ajustado consoante a reacção ou o método de electroforese (Tabela 4). Os produtos de PCR foram armazenados a 4°C ou a -20°C caso a sua utilização seja mais demorada.

Tabela 3 - Volume de cada componente para preparação das misturas de reacção de PCR *simplex*.

Misturas de reacção para PCR <i>simplex</i>	
Reagentes	Volume (µl)
Água bidestilada estéril	11,8
Tampão 10x (NZYtech)	2,5
DMSO	1
MgCl ₂ 25mM (Quiagen)	1,5
dNTP 5mM (NZYtech)	2
Primer Forward*	1
Primer Reverse*	1
NZYTaq DNA polimerase 5U/µl (NZYtech)	0,2
DNA (2-5 ng/ µl)	2
Total	25

*A concentração dos *primers* não marcados é de 20 pmol/µl. Nos *primers* marcados a concentração é de 2 pmol/µl para o *locus* 0577, 3690 e 1955; 8 pmol/µl para o *locus* 4052; 20 pmol/µ para o *locus* 4156 e 4 pmol/µl para os restantes *loci*.

As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se no Anexo 2.

Tabela 4 - Programa de PCR *multiplex*.

Duração (minutos)	Temperatura
15	95°C
1	94°C
1	59°C
1,30	72°C
10	72°C
∞	4°C

O número de ciclos para a análise automática foi de 30 para a mistura 1, 2, 4, 6, 7 e 8 e de 35 ciclos para a mistura 3 e 5. Se a análise for manual devem ser executados 40 ciclos para todas as reacções.

2.3.3 ANÁLISE DO PRODUTO POR ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) com o brometo de etídio (concentração final: 0,5 µl/ml). Para preparação das amostras foram utilizados, por amostra, 6 µl de água bidestilada estéril, 4 µl do produto de PCR e 2 µl de tampão de aplicação 6X. O marcador de pesos moleculares *NZYDNA Ladder VI* (*NZYTech, Lisboa, Portugal*) foi aplicado em três poços e após aplicação total das amostras de amplificação no gel, procedeu-se à electroforese durante 3h a 100V.

2.3.4 ANÁLISE DO PRODUTO POR ELECTROFORESE CAPILAR

Para realização da electroforese capilar, foram aplicados 1,2 µl do produto de PCR numa placa de 96 poços contendo 15 µl de formamida HI-DI (*Applied Biosystem®*, *Foster City, USA*) e 0,35 µl de marcador *MapMarker 100-1200 ROX* (*Bioventures, USA*), por poço.

Após à aplicação, as amostras foram desnaturadas a 94°C durante 10 minutos e imediatamente refrigeradas. De seguida, a placa foi enviada para electroforese capilar num sequenciador *AbPrism® 3130XL Genetic Analyser* (*Applied Biosystems®*, *Foster City, USA*).

2.3.5 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Gel de agarose

A interpretação dos resultados obtidos através do gel de electroforese a 2% consiste na análise do tamanho de fragmento de acordo com o marcador utilizado, tal como demonstrado na Figura 6. Para cada tamanho de banda foi atribuído um alelo. Os valores obtidos são analisados na base de dados online MIRU-VNTR Plus (www.miru-vntrplus.org).

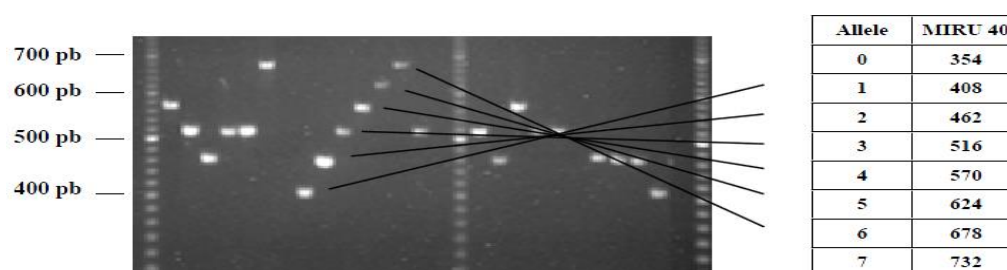


Figura 6 - Identificação alélica por MIRU-VNTR do locus 40 (adaptado de Supply et al., 2005).

Electroforese capilar

Os resultados obtidos por electroforese capilar das reacções de amplificação multiplex foram analisados através do software Peak Scanner (*Applied Biosystems*®, Foster City, USA), que permite distinguir os diferentes picos correspondentes a produtos de amplificação consoante a sua marcação fluorescente. O tamanho do produto de PCR foi automaticamente calculado pelo *software* referido através da comparação com a posição do marcador de tamanho padrão. O valor obtido é comparado com os valores tabelados para cada *locus* VNTR de forma a determinar o alelo correspondente. Na maioria das vezes os picos individuais são acompanhados de picos de menor intensidade (picos *stutter*), que não foram considerados. Nos casos em que foram detectados picos com intensidade semelhante repetiu-se a amplificação por PCR *multiplex* ou *simplex* para os *loci* em causa. Os alelos obtidos para cada *locus* e para cada isolado foram posteriormente analisados na base de dados online MIRU-VNTR Plus (www.miru-vntrplus.org).

2.4 SPOLIGOTYPING

2.4.1 PREPARAÇÃO DA MEMBRANA

De modo a preparar a membrana de nitrocelulose (*Pall Corporation*, Port Washington, USA) com as sondas imobilizadas, diluíram-se os oligonucleótidos (ver Anexo 5) em 150 µl de NaHCO₃ 500mM a pH 8,4. De seguida, activou-se a membrana por incubação em 10 ml de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDAC) a 16% (p/v, preparado no dia) durante 10 minutos na garrafa de hibridação à temperatura ambiente. A membrana foi lavada em água destilada durante 2 minutos e foi colocada no *miniblotter*, tendo em atenção se todos os poços estão na área da membrana. A água em excesso foi retirada por aspiração e em seguida foram aplicados, em cada um dos poços, 150 µl de cada sonda (previamente diluída). Os poços das extremidades foram utilizados para marcação do limite da membrana através da aplicação de tinta de caneta permanente, diluída a 1:100 em SSPE 2x.

A preparação das soluções utilizadas encontra-se descrita no Anexo 4.

2.4.2 AMPLIFICAÇÃO

Para realização do PCR foram necessários 10 ng de DNA. Como controlo positivo foram utilizados: o DNA do *M. tuberculosis* H37Rv e do *M. bovis* BCG. Na reacção de controlo negativo foi utilizada água bidestilada estéril em substituição da solução de DNA. O DNA do *M. tuberculosis* H37Rv e do *M. bovis* BCG permitiram verificar se todas as sondas estavam funcionais. Foram utilizados dois *primers* designados por DRa (5'-GGTTTGGGTCTGACGAC-3', biotinilado na extremidade 5') e DRb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'). O volume de cada componente utilizado para a amplificação do DNA encontra-se descrito na Tabela 5 e o programa de amplificação está descrito na Tabela 6.

Tabela 5 - Volume de cada componente para preparação da mistura de PCR de Spoligotyping.

Misturas para PCR de Spoligotyping	
Reagentes	Volume (µl)
Água bidestiladada estéril	30,3
Tampão 10 x	5
MgCl ₂ 25mM	1,5
dNTP 5mM	4
<i>Primers</i> DRa (5mM)	4
<i>Primer</i> DRb (5mM)	4
NZYTaq DNA polimerase 5 U/µl (NZYtech)	0,2
DNA (2-5 ng/ µl)	1
Total	50 µl

Tabela 6 - Programa de PCR de Spoligotyping.

Duração (minutos)	Temperatura	
3	96°C	
1	96°C	
1	55°C	} 40 x
0,30	72°C	
10	72°C	
∞	4°C	

2.4.3 HIBRIDAÇÃO

Para hibridação dos produtos de PCR, a membrana foi previamente lavada durante 5 minutos com 250 ml de 2xSSPE / 0.1% de SDS a 60°C. De seguida colocou-se a membrana no *miniblotter* de forma a que as sondas imobilizadas na membrana ficassem perpendiculares aos sulcos do *miniblotter*. Em paralelo, adicionou-se 20 µl do produto de PCR a 150 µl de SSPE 2x / 0,1% SDS, desnaturou-se durante 10 minutos a 100°C e de seguida colocou-se imediatamente em gelo. Antes de se colocarem as amostras no *miniblotter*, este foi aspirado para os sulcos ficassem completamente secos. De seguida os produtos de PCR diluídos foram aplicados no *miniblotter* de forma a não formar bolhas e hibridaram durante 60 minutos a 60°C numa superfície horizontal sem qualquer tipo de agitação. Em seguida, removeram-se as amostras de todos os poços por aspiração e retirou-se a membrana do *miniblotter*. A membrana foi de seguida lavada duas vezes em 250 ml de SSPE 2x / 0.5% de SDS durante 10 minutos a 60°C. Após a lavagem a membrana foi incubada numa garrafa de hibridação, com o conjugado de estreptavidina-peroxidase diluído a 1:4000 (2,5 µl do conjugado em 10 ml de SSPE 2x / 0.5% SDS) durante 60 minutos a 42°C. Lavou-se a membrana duas vezes com 250 ml de SSPE 2x / 0.5% SDS durante 10 minutos a 42°C. De seguida lavou-se a membrana duas vezes, à temperatura ambiente, com 250 ml de SSPE 2x durante 5 minutos com ligeira agitação.

2.4.4 DETECÇÃO DA QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Para detecção da quimioluminescência a membrana foi incubada durante 1 minuto em 20 ml de reagente de detecção (*Amersham ECL Detection Reagent; GE Healthcare, Carnaxide, Portugal*). A membrana foi envolvida em plástico numa cassete de revelação e a partir deste passo todos os restantes foram realizados numa câmara escura. Colocou-se o filme de quimioluminescência (*Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Carnaxide, Portugal*) em contacto com a membrana durante 15 minutos para revelação da imagem. De seguida, colocou-se o filme numa solução reveladora, lavou-se com água corrente e foi colocado numa solução fixadora.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS ORIUNDOS DA GUINÉ-BISSAU

3.1.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No presente estudo foram caracterizados 13 isolados clínicos oriundos da Guiné-Bissau, provenientes de 7 (53,8%) doentes do sexo masculino e 6 (46,2%) do sexo feminino, cujas idades variaram entre os 19 e os 72 anos (Figura 8). Dos 13 isolados clínicos em estudo verificou-se que 9 (69,2%) apresentaram resistência cumulativa à isoniazida e à rifampicina, tendo sido classificados como isolados multirresistentes (Tabela 7). Não foram detectados isolados TB-XDR.

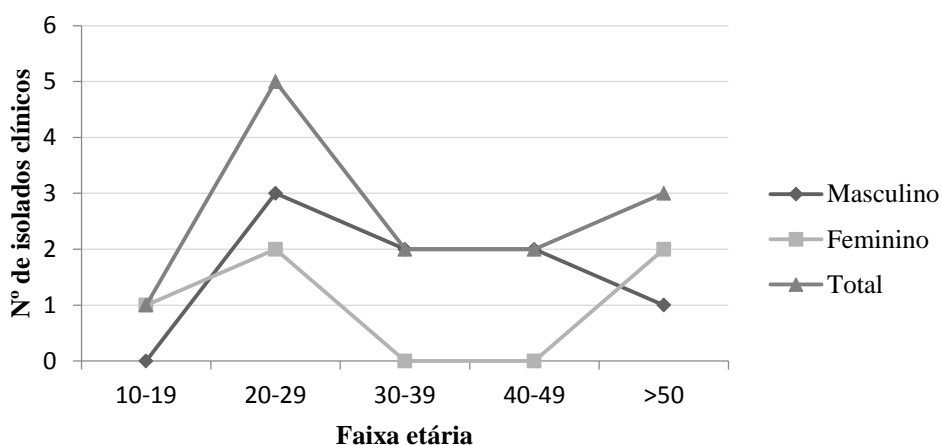


Figura 8 - Número de isolados oriundos da Guiné-Bissau por faixa etária e género.

Tabela 7 - Dados demográficos e o padrão de susceptibilidade dos isolados clínicos oriundos da Guiné-Bissau.

Isolado	Género ^a	Idade	Susceptibilidade a antibacilares de primeira e segunda linha ^b												
			S	I	R	E	P	OFX	CAP	AMK	RFB	ETH	PAS	LZ	MOX
G65	M	24	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
G73	M	41	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
G44	M	62	S	S	S	S	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
G67	F	72	S	S	S	S	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
G4	F	20	S	S	S	S	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
G3	F	20	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S
G23	F	70	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S
G24	M	42	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S
G42	F	19	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S
G104	M	29	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S
G57	F	28	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
G41	M	39	S	S	S	S	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
G77	M	33	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S

^a Gênero: M- masculino; F- feminino.

^b Antibacilares de primeira e segunda linha: S- Estreptomicina; I- Isoniazida; R- Rifampicina; E- Etambutol; P- Pirazanamida; OFX- Ofloxacina; CAP- Capreomicina; AMK- Amicacina; RFB- Rifabutina; ETH- Etionamida; PAS- Ácido para-amino-salicílico; LZ- Linezolid; MOX- Moxifloxacina; nd- não determinado; R- Resistente; S- Sensível.

3.1.2 GENOTIPAGEM POR SPOLIGOTYPING

Com a finalidade de caracterizar as estirpes do ponto de vista da epidemiologia molecular e de as posicionar num contexto macroepidemiológico global, foram genotipadas pela técnica de Spoligotyping. Os perfis obtidos foram analisados e classificados através da base de dados online SITVIT WEB (Tabela 8) (Demay et al., 2012). Os perfis de Spoligotyping obtidos demonstraram que dos 13 isolados, 8 pertencem à linhagem Beijing, 2 à (sub)-linhagem LAM9, 2 à (sub)-linhagem AFRI_1 e 1 à (sub)-linhagem T1 (Tabela 8).

Os isolados pertencentes à linhagem Beijing (G3, G104, G77, G23, G24, G57, G42 e G41) apresentaram um perfil de hibridação idêntico (SIT 1) com sinal nos últimos 9 espaçadores. À semelhança dos isolados Beijing, os isolados LAM (G65 e G73) também apresentaram um perfil idêntico entre eles (SIT 42), mostrando ausência de sinal nos espaçadores 21 a 24 e 33 a 36, característico das estirpes LAM. Dois dos isolados em estudo (G44 e G67) pertencem ao clade AFRI_1 (*M. africanum*) mas não apresentam um perfil completamente idêntico uma vez que, o isolado G44 apresenta uma deleção adicional do espaçador número 32.

Ao nível da distribuição dos isolados resistentes pelos diferentes clades verificou-se que dos 9 isolados TB-MR, 7 são Beijing e os restantes 2 pertencem ao clade LAM9.

Tabela 8 - Perfil de Spoligotyping dos isolados clínicos em estudo oriundos da Guiné-Bissau em 2012.

Identificação	Spoligotyping	Clade	SIT	Perfil de Spoligotyping
G65	7777776077760771	LAM9	42	
G73	7777776077760771	LAM9	42	
G44	770777777767671	AFRI_1	187	
G67	77077777777671	AFRI_1	181	
G4	777777777760601	T1	244	
G3	000000000003771	Beijing	1	
G23	000000000003771	Beijing	1	
G24	000000000003771	Beijing	1	
G42	000000000003771	Beijing	1	
G104	000000000003771	Beijing	1	
G57	000000000003771	Beijing	1	
G41	000000000003771	Beijing	1	
G77	000000000003771	Beijing	1	

3.1.3 GENOTIPAGEM POR MIRU-VNTR

Com o intuito de se obter uma caracterização genotípica de maior poder discriminatório e assim identificar possíveis genótipos envolvidos em episódios de transmissão recente, os isolados clínicos oriundos da Guiné-Bissau foram ainda genotipados pela técnica de MIRU-VNTR 24 *loci* (Supply et al., 2006). Foram detectados dois *clusters* distintos, envolvendo estirpes Beijing. Um dos *clusters* é formado pelas amostras G3 e G104 e o outro pelas amostras G77, G23 e G24. As restantes estirpes Beijing não agrupam em nenhum *cluster*. Os dendrogramas foram realizados com a distância categoria DSW (Stepwise weithed) e UPGMA (Unweght Pair Group Method with Arithmetic Avoreges)

3.2 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS PROVENIENTES DE DOENTES DA REGIÃO DE SAÚDE DE LISBOA COM NACIONALIDADE GUINEENSE

3.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Dada a presença em Portugal de uma grande comunidade de imigrantes provenientes de Países Africanos de língua oficial Portuguesa, procurou-se comparar a estrutura populacional das estirpes provenientes da Guiné-Bissau com as estirpes circulantes na comunidade de indivíduos de nacionalidade guineense na Região de Saúde de Lisboa. Para este fim, foram estudados os isolados clínicos com diagnóstico nesta região mas provenientes de doentes de nacionalidade guineense entre 2008 e 2009. Foram analisados 26 doentes dos quais 19 (73.1%) são do sexo masculino e 7 (26.9%) do sexo feminino. As idades variaram dos 18 aos 63 anos. Na faixa etária dos 11 aos 20 anos existem três casos do género masculino, dos 21 aos 30 foram encontrados cinco casos do sexo masculino e quatro do sexo feminino. Dos 31 aos 40 anos existem quatro casos do sexo masculino, entre os 41 e 50 anos existem dois casos do sexo feminino e cinco do masculino, dos 51 aos 60 apenas existem dois casos são do sexo masculino (Figura 10).

Foi apenas encontrado um isolado (TB 8868) com perfil de multirresistência (resistente à estreptomicina, isoniazida, rifampicina, capreomicina e etionamida). As restantes amostras são sensíveis aos fármacos de primeira linha (Tabela 9).

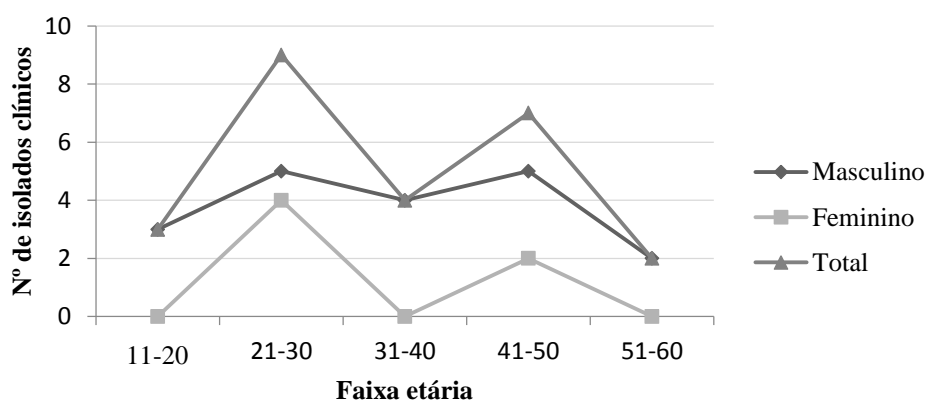


Figura 10 - Número de isolados clínicos com diagnóstico em Portugal provenientes de doentes de nacionalidade guineense por faixa etária e género.

Tabela 9 - Dados demográficos dos doentes de nacionalidade guineense e susceptibilidade de isolados clínicos com diagnóstico em Portugal entre 2008 e 2009.

Isolado	Género ^a	Data de nascimento	Idade de diagnóstico	Susceptibilidade a antibacilares de primeira linha ^b					Susceptibilidade a antibacilares de segunda linha ^c
				S	I	R	E	P	
TB 8868	M	17-01-1949	60	R	R	R	S	S	CAP, ETH
TB 8659	M	21-06-1956	53	S	S	S	S	S	nd
TB 8277	M	01-01-1968	41	S	S	S	S	S	nd
TB 8044	F	14-07-1967	42	S	S	S	S	S	nd
TB 2662	F	24-10-1985	24	S	S	S	S	S	nd
TB 7962	M	23-05-1962	47	S	S	S	S	S	nd
TB 7835	F	12-04-1986	23	S	S	S	S	S	nd
TB 7782	M	04-08-1978	31	S	S	S	S	S	nd
TB 7780	M	08-03-1979	30	S	S	S	S	S	nd
TB 7484	M	02-04-1966	43	S	S	S	S	S	nd
TB 7436	M	03-03-1990	19	S	S	S	S	S	nd
TB 7009	M	20-05-1990	19	S	S	S	S	S	nd
TB 6649	M	17-03-1991	18	S	S	S	S	S	nd
TB 6558	M	12-09-1984	25	S	S	S	S	S	nd
TB 5957	M	18-03-1967	41	S	S	S	S	S	nd
TB 5552	M	12-09-1963	45	S	S	S	S	S	nd
TB 4987	M	20-04-1972	36	S	S	S	S	S	nd
TB 4100	F	22-05-1984	24	S	S	S	S	S	nd
TB 3760	F	15-03-1981	27	S	S	S	S	S	nd
TB 3662	F	03-04-1965	43	S	S	S	S	S	nd
TB 3166	M	14-06-1968	40	S	S	S	S	S	nd
TB 3004	M	30-06-1987	21	S	S	S	S	S	nd
TB 2639	M	02-12-1983	25	S	S	S	S	S	nd
TB 2487	F	21-09-1980	28	S	S	S	S	S	nd
TB 2187	M	06-12-1970	38	S	S	S	S	S	nd
TB 1762	M	26-02-1983	25	S	S	S	S	S	nd

^a Género: M-masculino; F- feminino.

^b Susceptibilidade a antibacilares de primeira linha: S- Estreptomina; I- Isoniazida; R- Rifampicina; E- Etambutol; P- Pirazinamida; R- Resistente; S- Sensível.

^c Susceptibilidade a antibacilares de segunda linha: CAP- Capreomicina; ETH- Etionamida; nd- não determinado.

3.2.2 GENOTIPAGEM POR SPOLIGOTYPING

Para a avaliação dos isolados clínicos num contexto macroepidemiológico e do ponto de vista molécula foi novamente utilizada a técnica de Spoligotyping (Demay et al., 2012). Para estes isolados apenas foi realizado Spoligotyping devido às quantidades de DNA disponíveis.

Os perfis de Spoligotyping obtidos demonstraram a existencia de cinco *clusters* nesta amostras (Figura 11). No geral, foram detectados 10 (38.5%) isolados pertencentes à linhagem LAM, das quais 4 foram classificadas como LAM9, 3 como LAM1 e as restantes 3 como LAM3; 4 (15.4%) pertencentes à linhagem Beijing; 3 (11.5%) à (sub)-linhagem T1; 2 (7.7%) foram classificados como pertencentes à (sub)-linhagem MANU2; 2 (7.7%) apresentaram classificação ambígua; e 2 (7.7%) isolados clínicos apresentaram um perfil que não consta na base de dados SITVIT WEB (Tabela 10).

Os dois isolados (TB 8868 e TB 2187) da (sub)-linhagem MANU2 não apresentam um perfil de Spoligotyping completamente idêntico uma vez que o isolado TB 8868 apresenta uma deleção adicional no espaçador número 3 (Tabela 10). Para além das amostras da (sub)-linhagem LAM9 em *cluster*, foi identificada outra amostra LAM9 (TB 2662). O seu perfil difere dos restantes isolados clínicos pela deleção adicional do espaçador número 10. Para além dos isolados em *cluster* da (sub)-linhagem LAM3 (TB 8659 e TB 4987) foi encontrado outro isolado da linhagem (TB 5957) que apresenta duas deleções adicionais no espaçador número 7 e 27. Para a (sub)-linhagem T dois isolados em *cluster* (TB 7009 e TB 2487) apresentaram uma deleção adicional de quatro espaçadores quando comparados com o isolado TB 7962.

Para dois dos isolados clínicos em estudo (TB 4100 e TB 6649) não foi possível uma classificação concreta, uma vez que o algoritmo do SITVIT WEB não conseguiu definir qual a linhagem específica dos isolados (classificação ambígua). Enquanto que, para os isolados TB 3760 e TB 3662 não foram encontradas na base de dados SITVIT WEB estirpes com o mesmo perfil. O isolado da (sub)-linhagem AFRI (TB 7780) e (sub)-linhagem AFRI_1 (TB 7484) apresentam perfis de Spoligotyping bastante distintos. O isolado TB 7780, possui uma deleção dos

espaçadores 6 a 10, 31 a 33 e 38 enquanto o isolado TB 7484 tem deleção dos espaçadores 7 a 9, 20 a 24, 26 a 29 e 38. O isolado TB 7835 é o único da linhagem CAS e o seu perfil é definido apenas pela presença dos espaçadores 1 a 3 e 8 a 21. As amostras da linhagem Beijing têm o perfil de Spoligotyping característico, contendo apenas os últimos 9 espaçadores.

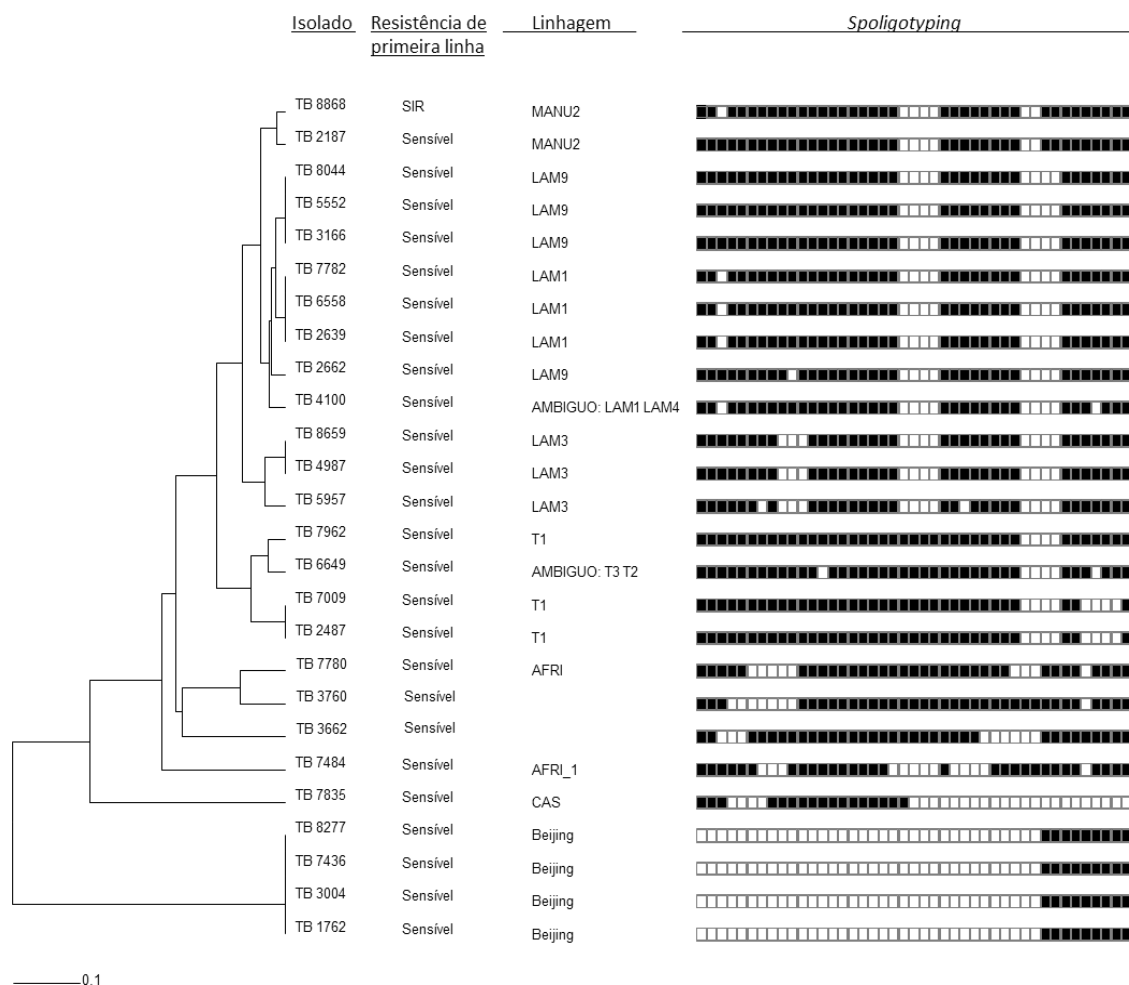











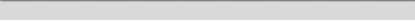

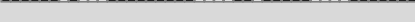

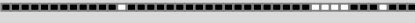

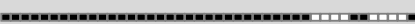










Figura 11 – Dendrograma de análise genotípica por Spoligotyping dos isolados clínicos com diagnóstico em Portugal mas nacionalidade da Guiné-Bissau. Resistência de primeira linha: S- Estreptomicina; I- Isoniazida; R- Rifampicina. Para os isolados TB 3760 e TB 3662 não foram encontradas estirpes com o mesmo perfil de Spoligotyping na base de dados SITVIT WEB.

Tabela 10 - Perfil de Spoligotyping dos isolados clínicos em estudo com diagnóstico em Portugal entre 2008 e 2009 mas com nacionalidade da Guiné-Bissau.

Isolado	Spoligotyping (código octal)	Clade	SIT	Perfil de Spoligotyping
TB 8868	677777607763771	MANU2	ORPHAN	
TB 2187	777777607763771	MANU2	1247	
TB 8044	777777607760771	LAM9	42	
TB 5552	777777607760771	LAM9	42	
TB 3166	777777607760771	LAM9	42	
TB 2639	677777607760771	LAM1	20	
TB 6558	677777607760771	LAM1	20	
TB 7782	677777607760771	LAM1	20	
TB 2662	777377607760771	LAM9	81	
TB 4100	677777607760731	AMBIGUO: LAM1 LAM4	1321	
TB 8659	776177607760771	LAM3	33	
TB 4987	776177607760771	LAM3	33	
TB 5957	772177606760771	LAM3	1759	
TB 7962	777777777760771	T1	53	
TB 6649	777737777760731	AMBIGUO: T3 T2	73	
TB 7009	777777777760601	T1	244	
TB 2487	777777777760601	T1	244	
TB 7780	760377777743671	AFRI	ORPHAN	
TB 3760	700377777777671	nd ^a	nd ^a	
TB 3662	6177777777403771	nd ^a	nd ^a	
TB 7484	7707777404177671	AFRI_1	ORPHAN	
TB 7835	7037777000000000	CAS	ORPHAN	
TB 8277	000000000003771	Beijing	1	
TB 7436	000000000003771	Beijing	1	
TB 3004	000000000003771	Beijing	1	
TB 1762	000000000003771	Beijing	1	

^a Não foram encontrados perfis de Spoligotyping iguais na base de dados SITVIT WEB.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS RESISTENTES PROVENIENTES DA REGIÃO DE SAÚDE DE LISBOA

3.3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No presente estudo foram caracterizados 14 isolados clínicos, na sua maioria TB-MR, oriundos da Região de Saúde de Lisboa e, no decurso deste trabalho, enviados ao Laboratório de Micobactérias do Instituto de Investigação do Medicamento da Universidade de Lisboa (iMed.Ulisboa) para genotipagem. Oito (57,1%) isolados são provenientes do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e seis (42,9%) isolados são provenientes do Hospital de Curry Cabral.

O isolado IHMT 269/03 é monorresistente; o IHMT 49/07, IHMT 139/07 e o IHMT 20/08 são TB-XDR e os restantes são TB-MR (Tabela 11). Para os isolados HCC, na data de escrita da tese, a informação obtida foi de que todos eram TB-MR.

Tabela 11 - Dados demográficos dos isolados clínicos com diagnóstico em Portugal.

Isolado	Género ^a	Idades ^b	Susceptibilidade a antibacilares de primeira e segunda linha ^c												
			S	I	R	E	P	OFX	CAP	AMK	RFB	ETH	PAS	LZ	MOX
IHMT 269/03	F	D	S	R	S	S	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IHMT 49/07	M	23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
IHMT 96/07	M	34	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
IHMT 139/07	M	50	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
IHMT 256/07	M	33	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R
IHMT 320/07	M	27	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S
IHMT 397/07	M	D	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
IHMT 20/08	F	36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R

^a Género: M - masculino; F - feminino.

^b Idade: D – idade desconhecida

^c Susceptibilidade a antibacilares de primeira linha e segunda linha: S - Estreptomicina; I – Isoniazida; R- Rifampicina; E- Etambutol; P- Pirazinamida; OFX- Ofloxacina; CAP- Capreomicina; AMK- Amicacina; RFB- Rifabutina; ETH- Etionamida; PAS- Ácido para-amino-salicílico; LZ- Linezolid; MOX- Moxifloxacina; nd-não determinado; R- Resistente; S- Sensível.

3.3.2 GENOTIPAGEM POR SPOLIGOTYPING

Este conjunto de estirpes foi igualmente analisado pela técnica de Spoligotyping, tendo-se encontrado 4 *clusters*. No geral foram detectados 5 isolados da (sub)-linhagem T1, 6 isolados da linhagem LAM, dos quais 4 foram classificados como LAM4 e 2 como LAM1; e, 3 isolados pertencem à linhagem Beijing.

Três dos isolados da (sub)-linhagem T1 apresentam o mesmo perfil de Spoligotyping mas foram detectados mais 2 isolados desta (sub)-linhagem, em que um isolado apresenta uma deleção adicional no espaçador número 40 (IHMT 269/03) e outro apresenta uma deleção adicional de 4 espaçadores, do 38-41 (IHMT 96/07). Todas as amostras da linhagem LAM1, LAM4 e Beijing apresentam o mesmo perfil de Spoligotyping (Tabela 12).

Tabela 12 - Perfil de Spoligotyping dos isolados clínicos em estudo da região de saúde de Lisboa.

Identificação	Spoligotyping (código octal)	Clade	SIT	Perfil de Spoligotyping
IHMT 96/07	777777777760601	T1	244	
IHMT 397/08	777777777760771	T1	53	
HCC 646/13	777777777760771	T1	53	
HCC 735/13	777777777760771	T1	53	
IHMT 269/03	777777777760751	T1	612	
IHMT 256/07	677777607760771	LAM1	20	
IHMT 139/07	677777607760771	LAM1	20	
IHMT 49/07	777777607760400	LAM4	1106	
IHMT 320/07	777777607760400	LAM4	1106	
IHMT 20/08	777777607760400	LAM4	1106	
HCC 5/14	777777607760400	LAM4	1106	
HCC 1/14	000000000003771	Beijing	1	
HCC 3/14	000000000003771	Beijing	1	
HCC 4/14	000000000003771	Beijing	1	

3.3.3 GENOTIPAGEM POR MIRU-VNTR

Na análise por MIRU-VNTR a que estes isolados foram igualmente sujeitos incluíram-se os resultados da genotipagem de três isolados multirresistentes, já previamente caracterizados e pertencentes aos *clusters* mais importantes e associados com a TB-MR na Região de Saúde de Lisboa: IHMT 134/09 (Lisboa3-A), HCC 1470 (Lisboa3-B) e HCC 916/10 (Q1) (Perdigão et al., 2014). Através do dendrograma elaborado verificou-se a existência de 4 *clusters* MIRU-VNTR e que, excluindo os isolados introduzidos para efeitos de comparação, 6 (42.9%) dos 14 isolados genotipados encontram-se em *cluster* (Figura 12). Para a linhagem T1, detectou-se um *cluster* com os isolados HCC 646/13 e HCC 735/13. Para a (sub)-linhagem LAM4 os isolados IHMT 320/07, IHMT 20/08, HCC 916/10 pertencem ao *cluster* Q1 e para a (sub)-linhagem LAM9 forma-se outro *cluster*. Verificou-se que os isolados IHMT 256/07, IHMT 139/07, HCC 1470 pertencem ao *cluster* Lisboa3-B. Entre as estirpes Beijing, 2 dos 3 isolados (HCC 3/14 e HCC4/14) apresentam um perfil idêntico, formando um *cluster*.

3.4 COMPARAÇÃO DOS ISOLADOS ORIUNDOS DA GUINÉ-BISSAU COM OS ISOLADOS PROVENIENTES DA REGIÃO DE SAÚDE DE LISBOA

3.4.1 GENOTIPAGEM POR SPOLIGOTYPING

Comparou-se de seguida, numa análise conjunta, todos os isolados genotipados por Spoligotyping. Foram encontrados 7 *clusters* para as (sub)-linhagens T1, LAM1, LAM9, LAM4 e linhagem Beijing. Destes, 3 *clusters* (Beijing, T1 e LAM9) são compostos por isolados da Região de Saúde de Lisboa e isolados oriundos da Guiné-Bissau. Observou-se ainda que os *clusters* compostos pelas estirpes Lisboa3 e Q1, apenas incluem isolados provenientes da Região de Saúde de Lisboa. Estão, no entanto, bastante próximos das estirpes Lisboa3 os isolados LAM9 provenientes da Guiné-Bissau (Figura 13).

Todos os isolados foram agrupados segundo o seu SIT e perfil octal de forma a calcular a percentagem de cada SIT por região geográfica (Tabela 13).

Tabela 13 - Número de isolados em estudo de acordo com o SIT e perfil octal. Percentagens calculadas segundo o total por coluna.

Linhagem	SIT	Perfil Octal	Número de isolados (%)			
			GB ^a	GB.PT ^b	PT ^c	Total
LAM9	42	777777607760771	2 (15)	3 (12)	0	5 (9,4)
LAM9	81	777377607760771	0	1 (4)	0	1 (1,9)
T1	244	777777777760601	1 (8)	2 (8)	1 (7)	4 (7,5)
T1	612	777777777760751	0	0	1 (7)	1 (1,9)
T1	53	777777777760771	0	1 (4)	3 (21)	4 (7,5)
nd ^d		777777777760601	0	2 (8)	0	1 (1,9)
Beijing	1	000000000003771	8 (61)	4 (15)	3 (21)	15 (28,3)
MANU2	ORPHAN	677777607763771	0	1 (4)	0	4 (7,5)
MANU2	1247	777777607763771	0	1 (4)	0	1 (1,9)
LAM1	20	677777607760771	0	3 (12)	2 (14)	5 (9,4)
LAM3	33	776177607760771	0	2 (8)	0	2 (3,8)
LAM3	1759	772177606760771	0	1 (4)	0	1 (1,9)
LAM4	1106	777777607760400	0	0	4 (26)	4 (7,5)
AFRI_1	187	770777777767671	1 (8)	0	0	1 (1,9)
AFRI_1	181	770777777777671	1 (8)	0	0	1 (1,9)
AMBIGUOS: LAM1 LAM4	1321	677777607760731	0	1 (4)	0	1 (1,9)
AMBIGUOUS T3	73	777737777760731	0	1(4)	0	1 (1,9)
AFRI	ORPHAN	760377777743671	0	1(4)	0	1(4)
AFRI_1	ORPHAN	770777404177671	0	1(4)	0	1(4)
CAS	ORPHAN	703777700000000	0	1(4)	0	1(4)
Total			13	26	14	53

^a - GB: Isolados oriundos da Guiné-Bissau;

^b -GB.PT: Isolados da região de saúde de Lisboa mas com nacionalidade da Guiné-Bissau;

^c - PT: Isolados da região de saúde de Lisboa;

^d - nd: Não foram encontradas estirpes com perfis de Spoligotyping idênticos na base de dados SITVIT WEB

3.4.2 GENOTIPAGEM POR MIRU-VNTR

Genotipagem por MIRU-VNTR 12 loci

A análise por MIRU-VNTR 12 *loci* utiliza 12 *loci* distintos: 154, 580, 802, 960, 1644, 2059, 2531, 2687, 2996, 3007, 3192 e 4348. Através da análise do dendrograma verificou-se a existência de 6 *clusters* MIRU-VNTR compreendendo um total de 21 isolados e associados aos clades LAM4, LAM1, LAM9, T1 e Beijing. Nenhum dos *clusters* é composto, em simultâneo, por isolados oriundos da Região de Saúde de Lisboa e da Guiné-Bissau. À semelhança da análise comparativa da genotipagem por Spoligotyping, os isolados da (sub)-linhagem LAM9 (G65 e G73) formam um *cluster* individualizado dos restantes LAM, bastante próximas das estirpes Lisboa3 (Figura 14). Verificou-se ainda, que os isolados IHMT96/07 e G4 provenientes da Região de Saúde de Lisboa e Guiné-Bissau, respectivamente, apresentam-se bastante próximos, diferindo apenas em uma repetição num dos 12 *loci*.

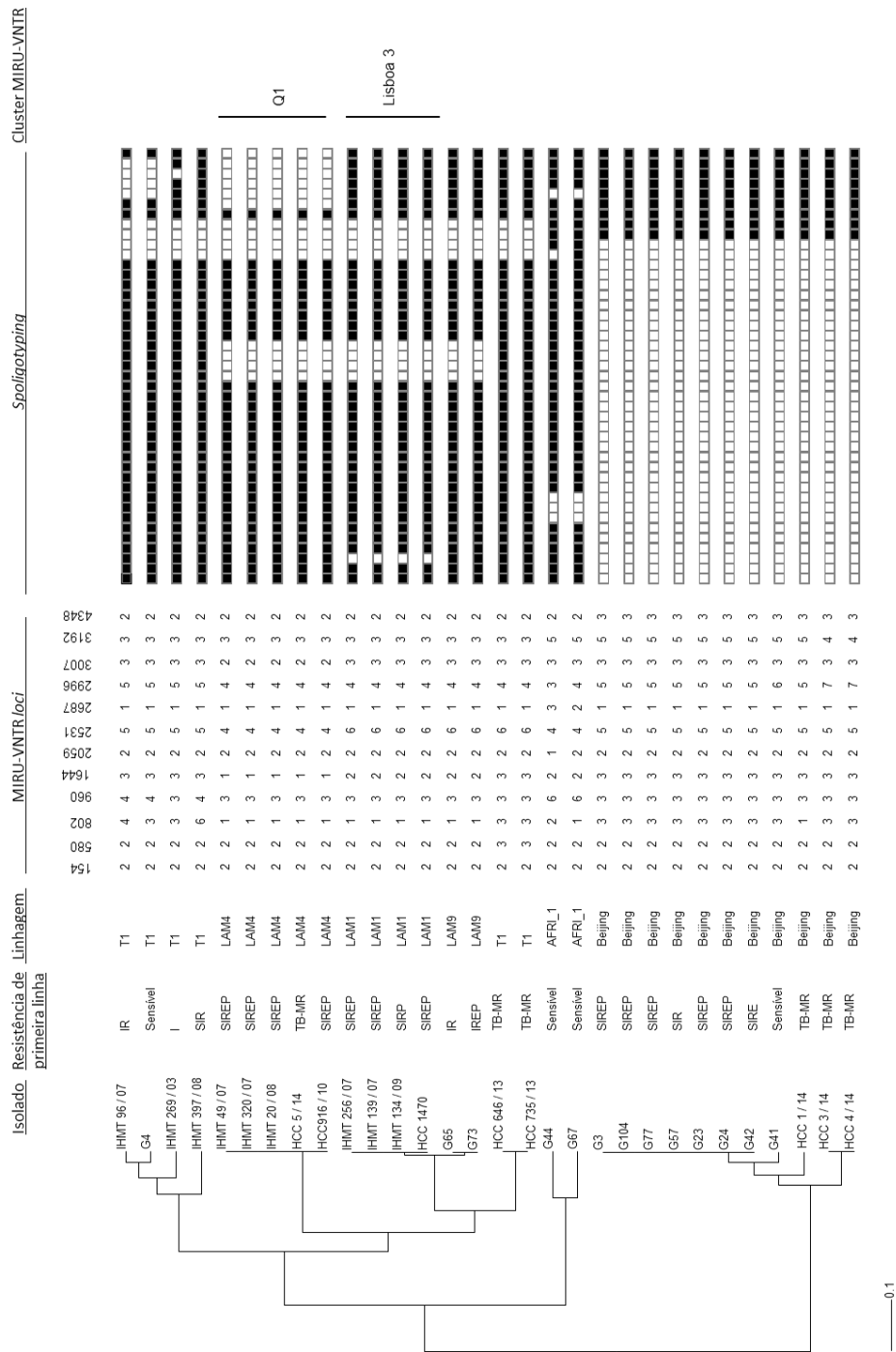


Figura 14 – Dendrograma de análise genotípica por MIRU-VNTR para MIRU 12 loci dos 30 isolados clínicos de *M. tuberculosis*. Resistência de 1ª linha: S- Estreptomicina; I- Isoniazida; R- Rifampicina; E- Etambutol; P- Pirazinamida; TB-MR - Na data de escrita da tese a informação obtida foi de que os isolados eram TB-MR.

Genotipagem por MIRU-VNTR 24 loci

A análise por MIRU-VNTR 24 loci baseia-se na avaliação de todos os 24 loci: 154, 424, 577, 580, 802, 960, 1644, 1955, 2059, 2163b, 2165, 2347, 2401, 2461, 2531, 2687, 2996, 3007, 3171, 3192, 3690, 4052, 4165 e 4348. Tratando-se de um conjunto com maior poder discriminatório. Verificou-se a existência de 5 clusters MIRU-VNTR, compreendendo um total de 13 isolados associados aos clades LAM4, LAM1 e Beijing (Figura 15). No dendrograma elaborado, as estirpes LAM9 provenientes da Guiné-Bissau mantêm-se a uma distância genética inferior a 0.1 das estirpes Lisboa3. O mesmo deixou de ser verdade para as estirpes T1 que apresentam, com este conjunto de loci, uma maior distância genética entre si.

A topologia dos dendrogramas elaborados com recurso ao conjunto de MIRU-VNTR 24 loci mostrou-se consistente com a distribuição dos diferentes clades definidos pela técnica de Spoligotyping quando comparado com o conjunto 12 loci.

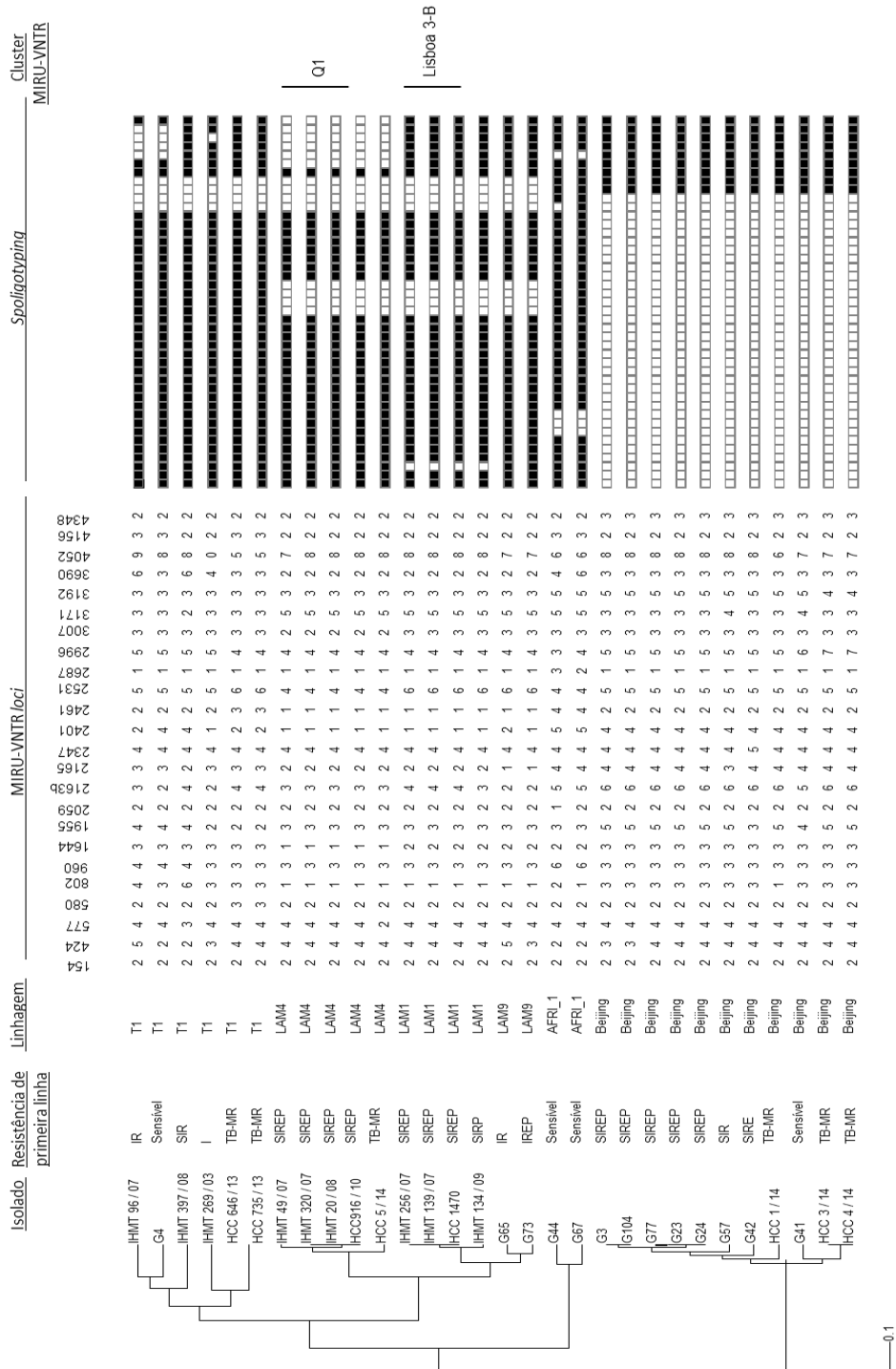


Figura 15 – Dendrograma de análise genotípica por MIRU-VNTR 24 loci dos 30 isolados clínicos de *M. tuberculosis*. Resistência de 1ª linha: S- Estreptomicina; I- Isoniazida; R- Rifampicina; E- Etambutol; P- Pirazinamida, TB-MR - Na data de escrita da tese a informação obtida foi de que os isolados eram TB-MR.

4. DISCUSSÃO

A TB é actualmente um problema de saúde pública. Portugal tem conseguido controlar o número de novos casos da doença, enquanto na Guiné-Bissau os valores têm vindo a aumentar (WHO, 2014b). A Guiné-Bissau é um país da África Subsaariana com relevância em Portugal pois 18% dos emigrantes com TB são oriundos da Guiné-Bissau (DGS, 2012). No presente estudo pretendeu-se contribuir para melhorar o conhecimento da situação epidemiológica da TB na Guiné-Bissau e a sua relação com Portugal.

A incidência da TB é variável ao longo dos diferentes grupos etários (Righi et al., 2015). A nível global, segundo a OMS, esta doença afecta mais o sexo masculino e a idade média da infecção são os 43 anos de idade (WHO, 2014). Em Portugal a idade média de diagnóstico é de 48 anos (WHO, 2010). No presente estudo as idades de diagnóstico variaram entre os 18 e os 72 anos e a faixa etária com maior incidência é dos 20-30 anos, para os isolados da Região de Lisboa e para os isolados oriundos da Guiné-Bissau. Trata-se, muito provavelmente, da camada mais activa da população e uma maior incidência neste grupo etário específico é um possível indicador, *a priori*, de um padrão de transmissão activa da TB na população estudada. Nas situações em que a incidência da TB apresenta uma tendência decrescente ao longo do tempo espera-se, de um ponto de vista epidemiológico, uma deslocação da incidência para grupos etários mais velhos (Borgdoff et al., 2001). Assume-se que tal se deve ao facto de a proporção de casos devidos à reactivação de uma infecção contraída anteriormente assumir uma maior importância, fazendo a incidência em grupos etários superiores reflectir um maior risco de infecção no passado (Borgdoff et al., 2001). Pelo contrário, os dados recolhidos durante este estudo indicam que a faixa etária em que existe maior incidência da infecção se situa abaixo da média global reportada pela OMS. No entanto, a amostra de isolados em estudo não pode ser considerada representativa devido à sua dimensão, pelo que os resultados obtidos, apesar de fornecerem uma indicação para a situação real, devem ser interpretados com prudência. Seria necessário uma amostra maior e representativa para confirmar este padrão de idades.

Gustafson *et al.* (2004), ao estudarem um conjunto de 247 isolados clínicos da Guiné-Bissau num período de 3 anos (1996 a 1998) verificaram que a maior incidência de casos ocorria no sexo masculino (67%). Em Portugal, Ferreira *et al.* (2014) estudaram durante quatro meses 78 doentes com TB activa e também verificaram uma maior incidência da doença no sexo masculino (66,7%). No presente estudo, também se verificaram mais isolados do sexo masculino, o que está de acordo com vários dados já publicados (DGS, 2014; Stival *et al.*, 2014; Borgdorff, 2001).

Neste trabalho um dos objectivos foi caracterizar e identificar estirpes de *M. tuberculosis* responsáveis por casos de TB, na sua maioria resistentes, oriundas da Guiné-Bissau assim como a sua diversidade e o seu posicionamento filogenético. Epidemiologicamente, segundo Groenheit *et al.* (2011) e dados fornecidos pela SITVIT WEB, as (sub)-linhagens mais prevalentes na Guiné-Bissau, são a AFRI_1 (46,9%) e a LAM9 (9,69%), verificando-se uma elevada percentagem de casos com SIT desconhecido (11,24%). Entre os isolados clínicos em estudo foram encontradas diversas (sub)-linhagens de *M. tuberculosis*: T1, LAM1, LAM3, LAM4, LAM9, MANU2, CAS e a linhagem Beijing. A última, representa 61% dos isolados clínicos em estudo oriundos da Guiné-Bissau, seguido da (sub)-linhagem LAM9 (SIT42), para 15% dos isolados. A linhagem Beijing na Guiné-Bissau demonstra uma prevalência superior, o que pode estar relacionado com o facto de as amostras recebidas serem na sua maioria (70%) TB-MR. Sugere-se que possa também estar a ocorrer gradualmente a introdução de novas estirpes, nomeadamente da linhagem Beijing. A sua introdução pode derivar de deslocações geográficas, ou seja, a sua origem pode estar noutro país.

De modo a contextualizar geograficamente as estirpes encontradas, realizou-se uma comparação das mesmas com isolados já descritos na base de dados MIRU-VNTRplus. Foi encontrada uma similaridade de 100%, utilizando 24 *loci*, entre três isolados (23%) da linhagem Beijing oriundos da Guiné-Bissau (G77, G23 e G24) e três estirpes descritas na antiga União Soviética. Estes dados sugerem que as estirpes Beijing, agora prevalentes na Guiné-Bissau, possam ter origem em países da antiga União soviética. Nos anos 80, Pokrovskii *et al.* (1998) estudaram vinte isolados clínicos para descreverem a introdução de VIH-2 no espaço da União Soviética

através de imigrantes provenientes de países da África ocidental e detectaram que 25% dos seus isolados pertenciam a doentes provenientes da África Ocidental, o que demonstra uma relação entre os vários países, nomeadamente a Guiné-Bissau (Pokrovskii et al., 1988). O facto de a África ocidental manter relações com países da antiga União Soviética, apoia a hipótese do fluxo de diferentes estirpes entre países de continentes não relacionados.

Os isolados AFRI_1 oriundos da Guiné-Bissau, pertencem aos SIT mais frequentes no país: SIT 181 (32,73%) e SIT 187 (12,27%) (SITVIT WEB). No estudo representam 16% dos isolados oriundos da Guiné-Bissau. Em Portugal foram também encontrados isolados AFRI_1 mas não pertencem ao mesmo SIT. Esta (sub)-linhagem já foi identificada em pacientes europeus sem ligação aparente ao continente Africano, o que remete para a mobilidade geográfica e consequente transmissão de estirpes endémicas de outros países ou continentes (De Jong et al. 2010). A (sub)-linhagem AFRI_1, SIT 181 e 187, é a principal (sub)-linhagem da família Guiné-Bissau, que tal como o nome indica é prevalente na Guiné-Bissau. Esta família caracteriza-se por os membros apresentarem um perfil de Spoligotyping AFRI-1; um perfil característico de RFLP-IS6110 com poucos locais de inserção da IS6110 e, por não possuírem as regiões de diferença ou deleções genómicas RD7, RD8, RD9, RD10, RD701 e RD702. Groenheit *et al.* (2014), investigaram isolados recolhidos entre 1989 e 2008, e para determinar as linhagens presentes compararam os perfis de Spoligotyping com a base de dados SITVIT2. Verificaram que a linhagem mais prevalente na Guiné-Bissau era a AFRI (47,10%), dos quais apenas um não pertencia à família Guiné-Bissau. Alguns isolados descritos como pertencentes a esta família apresentam o mesmo perfil de Spoligotyping que os isolados AFRI_1 oriundos da Guiné-Bissau encontrados neste estudo da família Guiné-Bissau. Estes dados sugerem que os isolados em estudo oriundos da Guiné-Bissau, da (sub)-linhagem AFRI_1, pertencem à família Guiné-Bissau mas seria necessário estudar as regiões de diferença para confirmação.

O presente estudo focou-se também na comparação por MIRU-VNTR 12 *loci* e 24 *loci* dos isolados provenientes da Guiné-Bissau com os isolados da Região de Saúde de Lisboa e ainda compará-los com os isolados da região de Lisboa mas cujos doentes têm nacionalidade Guineense (Guiné-Bissau). Utilizando um conjunto de 12

loci observaram-se 6 *clusters*, compreendendo um total de 22 isolados, enquanto que, com 24 *loci* observam-se 5 *clusters*, contendo 10 isolados. Como esperado, a introdução de um maior número de *loci* aumenta o poder discriminatório da técnica, o que se traduz num menor número de *clusters* e uma menor percentagem de isolados em *clusters* (33% vs 73%). Desta forma a utilização de MIRU 24 *loci* apresentou um maior poder discriminatório sendo um método alta resolução para estudos filogenéticos (Supply et al. 2006) e bastante utilizado em estudos epidemiológicos (Balcells et al., 2015; Sola et al., 2003). Os isolados em estudo da linhagem LAM1, LAM4 e LAM9 formam, para cada (sub)-linhagem, um *cluster* com a técnica MIRU 12 *loci* mas quando são avaliados por MIRU 24 *loci* só alguns isolados agrupam e os restantes surgem próximos do clade LAM correspondente. Uma vez que os *loci* utilizados no conjunto de 24 *loci* apresentam de forma geral uma maior diversidade alélica (Supply et al., 2006), este facto sugere uma diversificação mais recente entre isolados da mesma linhagem com uma origem comum. Para além de maior poder discriminatório, verificou-se que a topologia do dendrograma elaborado com recurso ao conjunto de 24 *loci* mostrou-se consistente com a distribuição dos diferentes clades definidos pela técnica de Spoligotyping quando comparado com o conjunto 12 *loci*, realçando a sua maior fiabilidade para uma análise filogenética.

Por outro lado a existência de *clusters* genéticos pela técnica MIRU-VNTR 24 *loci* aponta para a existência de transmissão recente da TB ao nível das diferentes regiões estudadas. Na Guiné-Bissau, esta situação foi detectada apenas ao nível das estirpes Beijing com um total de 2 *clusters* envolvendo 5 isolados TB-MR. Na Região de Saúde de Lisboa foram detectados 4 *clusters* envolvendo 9 isolados clínicos, todos TB-MR. A capacidade da técnica MIRU-VNTR 24 *loci* para identificar episódios de transmissão recente é evidenciada nesta região pela existência de um *cluster* com dois isolados provenientes de doentes que são familiares, em que se presume ter havido transmissão entre ambos (HCC 3/14 e HCC 4/14). Destaca-se pois, em ambos os locais, a ocorrência de episódios de transmissão recente independentes e que requerem medidas adicionais de modo a conter a propagação das diferentes estirpes associadas a estes casos.

Neste estudo analisaram-se ainda, de um ponto de vista genotípico, estirpes de *M. tuberculosis* circulantes na comunidade de imigrantes provenientes da Guiné-Bissau. Em Portugal, segundo a DGS, os imigrantes nacionais de Angola representam 22% dos novos casos de TB em estrangeiros, seguidos dos da Guiné-Bissau (18%), Cabo Verde (18%), Brasil (10%), Roménia (7%) e Moçambique (5%). Estima-se que no conjunto das comunidades, enquanto residentes em Portugal, a taxa de incidência é quatro vezes mais do que na população geral devido às condições de vida (DGS, 2012). De todos os casos relatados de TB em imigrantes residentes em Portugal, 67,5% têm origem na África Subsaariana (DGS, 2014). Gagneux *et al.* (2006) sugerem que mesmo num país que não o de origem, os imigrantes tendem a ser infectados pelas estirpes historicamente mais presentes nos respectivos países de origem (Gagneux *et al.*, 2006). Os dados obtidos contrariam esta ideia uma vez que mostram que a estrutura populacional encontrada na Região de Lisboa mas cujos doentes são oriundos da Guiné-Bissau é mais semelhante com a estrutura populacional da espécie em Portugal. Sugere-se assim que nesta comunidade a situação epidemiológica é na sua maior parte mais influenciada pela TB endémica em Portugal do que pela situação epidemiológica no seu país de origem.

A actual crise económica e o impacto social, assim como o aumento da taxa de desemprego, a distribuição monetária assimétrica, o *stress* e a deterioração das condições de vida, afectam a saúde pública da população, diminuindo a estabilidade imunitária (Couceiro *et al.*, 2011). Os fármacos de primeira linha são combinados de forma a potencializar a acção contra o *M. tuberculosis* e a prevenir o desenvolvimento de resistências (Müller *et al.*, 2013). No entanto os cuidados de saúde para doentes com TB-MR e TB-XDR são mais limitados e ineficazes, além de que, em países mais desfavorecidos o diagnóstico não é tão preciso nem o tratamento é adequado. Deste ponto de vista a OMS desenvolveu um plano de estratégia que tem como principal desafio reduzir a sua incidência. A nível global 3,5% de novos casos e 20,5% de casos já tratados foram casos de TB-MR em 2013 (WHO).

Neste estudo foram comparadas as amostras oriundas da Guiné-Bissau com amostras Portuguesas e foram introduzidos três isolados, já previamente caracterizados, representativos dos *clusters* Lisboa3 e Q1 (Perdigão *et al.*, 2014). A prevalência da família Lisboa nesta região pode representar até 74,0% a 80,0% dos

casos de TB-MR e TB-XDR, respectivamente (Perdigão et al., 2014). Foram encontrados na região de Lisboa isolados de ambos os *clusters*, quatro isolados clínicos pertencentes ao *cluster* Q1 e dois pertencentes ao *cluster* Lisboa3, representando 27% e 13% dos isolados clínicos da região de Lisboa, respectivamente. Entre os isolados destes *clusters* três deles são TB-XDR, representando 33% dos isolados Q1 e 50% dos isolados Lisboa3. Nos isolados clínicos oriundos da Guiné-Bissau e da região de Lisboa mas com nacionalidade Guineense não foi detectado nenhum isolado pertencente a estes *clusters*, o que demonstra a sua prevalência na capital Portuguesa. Com estes dados sugere-se que, para o desenvolvimento de TB-MR e TB-XDR em Portugal causada pelos *cluster* Lisboa3 e Q1, os imigrantes provenientes da Guiné-Bissau não contribuem para a sua epidemiologia porque, apesar de apresentarem isolados destes *clusters*, não são TB-MR.

No presente estudo verifica-se uma elevada prevalência entre os isolados TB-MR da região de Lisboa da linhagem Beijing, que representa 21% dos isolados. Tal facto pode estar associado com estirpes provenientes de outras zonas geográficas, pelo que seriam necessários estudos adicionais para compreender e monitorizar a introdução destas novas estirpes na região de Lisboa.

5. CONCLUSÃO

O trabalho desenvolvido teve como objectivos a caracterização e identificação de estirpes de *M. tuberculosis* responsáveis por casos de TB na Guiné-Bissau assim como analisar a diversidade genética dos isolados clínicos com origem na Guiné-Bissau e posicionar, num contexto macroepidemiológico, as estirpes identificadas. Foi também possível comparar estirpes provenientes da Guiné-Bissau, com estirpes circulantes na Região de Saúde de Lisboa, incluindo a comparação com estirpes de indivíduos de nacionalidade guineense (Guiné-Bissau).

A TB, tanto em Portugal como na Guiné-Bissau afecta mais o sexo masculino e está a surgir em idades cada vez mais novas (20-30 anos). Sugere-se que seja realizado um estudo com maior número de isolados para que seja possível confirmar estes dados devido à amostra em estudo ter um número reduzido de isolados.

A caracterização e identificação de estirpes de *M. tuberculosis* responsáveis por casos de tuberculose, na sua maioria resistentes, oriundos da Guiné-Bissau revelou uma maior incidência da linhagem Beijing (61%), seguida da (sub)-linhagem LAM9 (15%). A África Subsaariana e os países da antiga União Soviética mantêm algumas relações, o que pode estar associado à inserção de novas estirpes da linhagem Beijing. Seria de interesse para ambos os Países perceber que tipo de relação existe e até que ponto esta está a influenciar a inserção de novas estirpes na Guiné-Bissau. No futuro seria também interessante estudar as regiões de diferença de forma a verificar se os isolados AFRI_1 oriundos da Guiné fazem parte da família Guiné-Bissau.

A comparação por MIRU-VNTR 12 *loci* e 24 *loci* dos isolados provenientes da Guiné-Bissau com os isolados da Região de Saúde de Lisboa permitiu confirmar que a introdução de um maior número de *loci* aumenta o poder discriminatório da técnica, tendo o MIRU 24 *loci* um maior poder discriminatório e uma distribuição consistente no dendrograma, permitindo também verificar quando existe transmissão recente entre os isolados clínicos. Desta forma, confirma ser um método de alta resolução para estudos filogenéticos.

O presente estudo é de elevada relevância tanto para Portugal como para a Guiné-Bissau uma vez que os resultados obtidos permitem verificar que os isolados de doentes da Região de Lisboa mas oriundos da Guiné-Bissau são, em termos filogenéticos, mais semelhantes com a estrutura populacional Portuguesa. Provavelmente, a maioria será mais influenciada pela TB endémica em Portugal do que pela situação epidemiológica no seu país de origem. Conclui-se ainda que os imigrantes oriundos da Guiné-Bissau em Portugal não estão associados a genótipos com perfis de multirresistência, sendo então o problema da multirresistência endémico do próprio país. Verifica-se também que em Portugal existe uma elevada prevalência da linhagem Beijing, associada à multirresistência, mas seriam necessários estudos adicionais e forte vigilância epidemiológica de forma a monitorizar e compreender a disseminação destas estirpes na região.

6. BIBLIOGRAFIA

Abe, C. (2003) "Standardization of laboratory tests for tuberculosis and their proficiency testing.", *Kekkaku*, 78(8), pp.541-551.

Ahmad, S. (2011) "Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection.", *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2011, Article ID 814943, 17 pages.

Alexander, K., Laver, P., Michel, A., Williams, M., Van Helden P, et al. (2010) "Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, M. Mungi." *Emerging Infectious Diseases*, 16(8), pp.1296-1299.

Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Dominguez L. (2003) "Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. Nov.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, pp.1785-1789.

Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, J., Cousins, D. et al. (1999) "*Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain.", *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 49 (3), pp.1263-1273.

Ardito, F., Posteraro, P., Sanguinetti, M., Fadda, G. (2001) "Evaluation of BACTEC *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*.", *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), pp.4440-4444.

Balcells, M., García, P., Meza, P., Peña, C., Cifuentes M. et al. (2015) "A First Insight on the Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Complex as Studied by Spoligotyping and MIRU-VNTRs in Santiago, Chile", *Public Library Of Science neglected tropical diseases ONE*.

Barnard, M., Gey van Pittius, N., van Helden, P. Bosman, M., Coetzee, G. et al. (2012) "The diagnostic performance of the GenoType MTBDRplus version 2 line probe assay is equivalent to that of the Xpert MTB/RIF assay.", *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), pp.3712-3716.

Barnes, P.F. e Cave, M.D. (2007) "Molecular Epidemiology of tuberculosis", *The New England Journal of Medicine*, 349, pp.1149-1156.

Barrios-payán, J., Castanón-arreola, M. e Flores-valdez, M. (2010), "Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente", *Salud Pública de México*, 52(1).

Basu, S., Monira, S., Modi, R., Choudhury, N., Mohan, N. et al. (2014) "Degree, duration, and causes of visual impairment in eyes affected with ocular tuberculosis", *Journal of ophthalmic inflammation and infection*, 4(1), p.3.

Bemer, P., Palicova, F., Rusch-Gerdes, S., Drugeon, H., Pfyffer, G., (2002) "Multicenter Evaluation of Fully Automated BACTEC *Mycobacteria* Growth Indicator Tube 960 System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*", *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), pp.150-154.

Bolognesi, M. e Bolognesi, D. (2013) "Complicated and delayed diagnosis of tuberculous peritonitis", *The American journal of case reports*, 14, pp.109–12.

Bombarda, S., Figueiredo, C., Funari, M., Júnior, J., Seiscento, M. et al. (2001) "Imagem em tuberculose pulmonar", *Jornal de Pneumologia*, 27(6), pp.329–340.

Borgdorff, M., Nagelkerke, N., Hass, P. e Soolingen, D. (2001) "Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Depending on the Age and Sex or Source Cases", *American Journal of Epidemiology*, 154(10), pp.934-943.

Brodin, P., Eiglmeier, K., Marmiesse, M., Billault, A., Garnier, T. et al. (2002) "Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies *Mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6 Deletion Mutant", *Infection and Immunity*, 70(10), pp.5568-5578.

Burdas, D. (2009) "Tuberculoses: Can the spread of this killer disease be", *Society for General Microbiology*.

Cave, A.J.E. (1939) "The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient Egypt", *British Journal of tuberculosis*, 33(3), pp.142–152.

Caws, M., (2008) "The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*", *Public Library Of Science Pathogens*, 4(3), p.e1000034.

Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C. et al., (1998) "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence", *Nature*, 393(6685), pp.537 – 544.

Corbett, E., Watt, C., Walker, N., Maher, D., Williams, B. et al. (2003) "The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic", *Archives of internal medicine*, 163(9), pp.1009–21.

Couceiro, L., Santana, P., Nunes, C. (2011) "Pulmonary tuberculosis and risk factors in Portugal: a spatial analysis", *The International Journal of Tuberculosis and Lung Drug Disease*., 15, pp. 1445-1445(11).

Cousins, D., Williams, S., Reuter, R., Forshaw, D., Chadwick, B. ET AL. (1993) "Tuberculosis in wild seals and characterization of the seal bacillus." *Australian Veterinary Journal*, 70, pp.92-97.

Cousins, D., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S. et al. (2003) "Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), pp.1305–1314.

De Jong, B., Antonio, M. e Gagneux, S. (2010) "*Mycobacterium africanum*--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa" *Public Library Of Science neglected tropical diseases*, 4(9), pp.744.

Demay, C., Liens, B., Burguière, T., Hill, V., Couvin, D. et al. (2012) "SITVITWEB-a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology", *Infection, genetics and evolution*, 12(4), pp.755–66.

DGS (2014) “Infecção VIH, SIDA e Tuberculose em números- 2014”, Direcção Geral de Saúde – Ministério da Saúde.

DGS (2012) “Programa Nacional de Luta contra a tuberculose-Ponto da situação Epidemiológica e de Desempenho”, Direcção Geral de Saúde – Ministério da Saúde.

Dorman, S., Chihota, V., Lewis, J., Meulen, M., Mathema, B. et al. (2012) "Genotype MTBDRplus for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance in strains from gold miners in South Africa", *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), pp.1189–1194.

Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., Raviglione, M. et al. (1999) "Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project" ", *The Journal of the American Medical Association*, 282(7), pp.677–86.

Emmanuel, F., Seagar, A., Doig, C., Rayner, A., Claxton, P. et al. (2007) "Human and Animal Infections with *Mycobacterium*", Centers for Disease Control and Prevention, 13(12), pp.1924–1927.

Fine, P., Carneiro, I., Milstien, J., Clements, C. (1999) "Issues relating to the use of BCG in immunization programmes", *World Health Organization*, pp.45.

Ferreira, C., Pinto, T., Neves, I.; Duarte, R. (2014) “Gender differences in active tuberculosis”, *European respiratory Journal*, 44(58), P2688.

Formicola, V., Milanesi, Q., e Scarsini, C. (1987), "Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millennium BC from Arene Candide cave (Liguria, Italy)", *American journal of physical anthropology*, 72(1), pp.1–6.

Forrellad, M., Klepp, L., Gioffré, A., García, J., Morbidoni, H. et al. (2013), "Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex", *Virulence*, 4(1), pp.3–66.

Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., De Jong, B. et al (2006) “Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), pp. 2869-2873.

Geetha, R., Swaminathan, S. (2012) “Role of pharmacogenomics in the treatment of tuberculosis: a review.”, *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 5, pp.89-98.

Gey van Pittius, N., Helden P., Warren, R. (2012) "Characterization of *Mycobacterium orygis*.", *Emerging infection Disease*, 18, 1708-1709.

Groenheit, R., Ghebremichael, S., Svensson, J., Rabna, P., Colombatti, R. et al. “The Guinea-Bissau Family of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Revisited”, 2011, *Plos ONE*.

Gomez, J.; McKinney, J. (2004) "*M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance", *Tuberculosis*, 84(1-2), pp.29–44.

Guillet-Caruba, C., Martinez, V.; Doucet-Populaire, F., (2014) "Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie", *La Revue de Médecine Interne*, 35(12), pp.794–800.

Guirado, E., Schlesinger, L.; Kaplan, G. (2013) "Macrophages in tuberculosis: friend or foe", *Seminars Immunopathology*, 35(5), pp.563–583.

Gustafson, P., Gomes, V., Vieira, C. et al. (2004) "Tuberculosis in Bissau: incidence and risk factors in an urban community in subSaharan Africa.", *International Journal of Epidemiology*, 33, pp.163–172.

Hardie, R.M.; Watson, J. M. (1992) "*Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future", *Epidemiology and infection*, 109(1), pp.23–33.

Hershkovitz, I., Donoghue, H., Minnikin, D., Besra, G., Lee, O. et al. (2008) "Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean", *Public Library Of Science ONE*, 3(10), pe.3426.

Huard, R., Febre, M., Hass, P., Lazzarini, L., van Soolingen, D. et al. (2006) "Novel genetic polymorphism that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex", *Journal Bacteriology*, 188(12), 4271-4287.

Hur, M., Moon, H-W., Yun, Y-M., Kang, T., Kim, H-S. (2011) "Detection of using artus® *M. tuberculosis* PCR Kit and COBAS® AMPLICOR™ *Mycobacterium tuberculosis* Test", *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 15 (6), pp795-798

Santos, J., Figueiredo, A., Ferraz, C., Oliveira, M., Silva, P. et al (2014) "Cutaneous tuberculosis : diagnosis, histopathology and treatment", *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(4), pp.545–555.

Källenius, G. et al., (1999) "Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Guinea-Bissau", *Journal of Clinical Microbiology*, 37(12), pp.3872–3878.

Karakousis, P., Williams, E., Bishai, W. (2008) "Altered expression of isoniazid-regulated genes in drug-treated dormant *Mycobacterium tuberculosis*", *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(2), pp.323–331.

Kaufmann, S., McMichael, A. (2005) "Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis", *Nature medicine*, 11(4), pp.S33–S44.

Kaur, D., Guerin, M., Skovierová, H., Brennan, P., Jackson, M. (2009) "Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*", *Advances in Applied Microbiology*, 69, pp.23-78.

Lacoma, A., Garcia-Sierra, N., Prat, C., Ruiz-Manzano, J., Haba, L. et al. (2008) "GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples", *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), pp.3660–3667.

Lonroth, K., Migliori, G., Abubakar, I., Ambrosio, L., Vries, G. et al., (2015) "Towards tuberculosis elimination: an action framework for low-incidence countries", *European Respiratory Journal*, 45, pp.928–952.

Ma, E., Ren, L., Takahashi, H., Wagatsuma, Y., Ren, Y., Gao, F., Wang, W. e Bi, L. (2015) "Demographic and Socioeconomic Disparity in Knowledge About Tuberculosis in Inner Mongolia, China", *Journal of Epidemiology*, pp.1–9.

Machado, D., Ramos, J., Couto, I., Cadir, N., Narciso, I. et al. (2015) "Assessment of the BD MGIT TBc identification test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a network of mycobacteriology laboratories."

Mathema, B., Kurepina, N., Bifani, P. e Kreiswirth, B. (2006) "Molecular epidemiology of tuberculosis: Current insights", *Clinical Microbiology Reviews*, 19(4), pp.658–685.

Mirret, S., Hanson, K., Reller, L. (2007) "Controlled Clinical Comparison of VersaTREK and BacT/ALERT Blood Culture Systems", *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), pp.299-302.

Müller, B., Borrel, S., Rose, G. e Gagneux, S. (2013) "The Heterogeneous Evolution of multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*", *Trends in Genetics*, 29(3), pp.160–169.

Neonakis, I., Gitti, Z., Baritaki, S., Petinaki, E., Baritaki, M. e Spandidos, D. (2009) "Evaluation of GenoType mycobacteria direct assay in comparison with gen-probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and GenoType MTBDRplus for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples", *Journal of Clinical Microbiology*, 47(8), pp.2601–2603.

O'Reilly, L.M. e Daborn, C.J. (1995) "The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review", *Tubercle and lung disease*, 76, pp.1–46.

Oliveira, M., De, Figueiredo, A.R. & Gomes, P., (2014) "Cutaneous tuberculosis : epidemiologic, etiopathogenic and clinical aspects - Part I", *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(2), pp.219–228.

Parsons, S., Drewe, J., Gey van Pittius, N., Warren, R. e Helden, P. (2013) "Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa", *Emerging Infectious Diseases*, 19(12), pp.2004–2007.

Perdigão, J., Macedo, R., Silva, C., Machado, D., Couto, I., Viveiros, M., Jordao, L. e Portugal, I. (2013) "From multidrug-resistant to extensively drug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: the stepwise mode of resistance acquisition.", *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(1), pp.27–33.

Perdigão, J., Silva, H., Machado, D., Macedo, R., Maltez, F., Silva, C. et al. (2014) "Unraveling *Mycobacterium tuberculosis* genomic diversity and evolution in Lisbon, Portugal, a highly drug resistant setting", *Biomedcentral genomics*, 15(991), p.20.

Pokrovski, V., Suvorova, Z. e Mangushev, T. (1988) "Infection caused by the human immunodeficiency virus type 2 in the USSR", *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, (10), pp.18-20.

Pósa, A., Maixner, F., Zink, A., Lovász, G., Molnár, E., Bereczki, A., Perrin, P. et al., (2012) "Ancient human tooth samples used for TB paleomicrobial research", *Acta Biologica Szegediensis*, 56(2), pp.125–131.

Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C. (2001) "The mycobacteria : an introduction to nomenclature and pathogenesis", *Revue scientifique et technique*, 20(1), pp.21–54.

Richter, E., Rüsch-Gerdes, S. Hillemann (2006) "Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures", *Journal of clinical Microbiology*, 44(5), pp.1769-1775.

Righi, E., Siega, P., Merelli, M., Castaldo, N., Beltrame, A. et al. (2015) "Comparicon of clinical characteristics of tuberculosis between two age groups at an Italian Tertiary Hospital", *Infection*.

Sakula, A., (1983a) "BCG : who were Calmette and Guerin ?" *Thorax*, 38(11), pp.806–812.

Sakula, A., (1983b) "Robert Koch : Centenary of the Discovery of the Tubercle Bacillus", *Canadian Veterinary Journal*, 1882, pp.127–131.

Scarparo, C., Piccoli, P., Rigon, A., Ruggiero, G., Nista, D. et al. (2001) "Direct Identification of Mycobacteria from MB/BacT Alert 3D Bottles: Comparative Evaluation of Two Commercial Probe Assays", *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), pp.3222–3227.

Shim, T., Jo, K. (2013) "Medical treatment of pulmonary multidrug-resistant tuberculosis", *Infection & chemotherapy*, 45(4), pp.367–74.

Soini, H., Musser, J. (2001) "Molecular Diagnosis of Mycobacteria", *Clinical Chemistry*, 47(5), pp.809-814.

Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Loch, C. et al (2003) "Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics", *Infection, Genetics and Evolution*, 3(2), pp. 125–133.

Steingart, K., Schiller, I., Horne, D., Pai, M., Boehme, C. et al. (2014) "Xpert ® MTB / RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults", *The Cochrane database of systematic reviews*, 1(1), p.CD009593.

Stival, A., Chiappini, E., Montagnani, C., Orlandini, E., Buzzoni, C. et al. (2014) "Sexual Dimorphism in tuberculosis Incidence: Children Cases Compared to Adult Cases in Tuscany from 1997 to 2011", *Public Library of Science*, 9(9), pe.105277.

Supply, P. (2005) "Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*", Technical Guide, Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille, pp.73

Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S. et al., (2006) "Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*", *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), pp.4498–510.

Talip, B., Sleator, R., Lowery, C., Dooley, J., Snelling, W. (2013) "An Update on Global Tuberculosis (TB)", *Infectious diseases*, 6, pp.39–50.

Van Soolingen, D., Haas, P., e Kremer, K., (2001) "Restriction fragment length polymorphism typing of mycobacteria", *Methods in molecular medicine*, 54, pp.165–203.

Van Deun, A., Aung, K., Bola, V., Lebeke, R., Hossain, M. et al. (2013) "Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: Challenging the gold standard", *Journal of Clinical Microbiology*, 51(8), pp.2633–2640.

Van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M., Simeone, R. et al.D. (2012) "Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies", *Emerging Infectious Diseases*, 18(4), pp.653–655.

Vasconcellos, S., Huard, R., Neimann, S., Kremer, K., Santos, A. et al. (2010) "Distinct genotypic profiles of the two major clades of *Mycobacterium africanum*", *Biomedicalgenomics Infectious Diseases*, 10(80).

Vilchèze, C., Wang, F., Arai, M., Hazbón, M., Colageli, R. et al, (2006) "Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* *inhA* resolves the target of isoniazid", *Nature*, 12(9), pp.1027.

Viveiros, M., Leandro, C., Rodrigues, L., Almeida, J., Bettencourt, R. et al. (2005) "Direct Application of the INNO-LiPA Rif.TB Line-Probe Assay for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains and Detection of Rifampin Resistance in 360 Smear-Positive Respiratory Specimens from an Area of High Incidence of Multidrug-Resistant Tuberculosis", *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9) , pp.4880-4884.

Walker, T., Harrell, R., Evans, J., Kapatai, G., Dedicoat, M. et al. (2013) "Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study", *Lancet Infectious Diseases*, 13(2), pp.137-146.

WHO (1997) "Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World", *World Health Organization*, pp.1–227.

WHO (2010a) "Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis", *World Health Organization*, pp.420.

WHO (2010b) "Executive summary Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global Report on Surveillance and Response", *World Health Organization*.

WHO (2014) "Updated: Xpert MTB/RIF implementation manual Technical and operational "how-to": practical considerations", *World Health Organization*.

WHO (2014a) "Global tuberculosis report 2014", *World Health Organization*.

WHO (2014b) "Tuberculosis Country Profile", *World Health Organization*, última atualização em 2015. [Consultado em 08-04-2014]. Disponível em <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/en/>.

WHO (2014c) "Indicators of diagnosis, notification and treatment of multidrug-resistant TB, by region or country and year", *World Health Organization*, última

atualização em 2015. [Consultado em 08-04-2015]. Disponível em https://extranet.who.int/sree/Reports?op=vs&path=/WHO_HQ_Reports/G2/PROD/EXT/MDRTB_Indicators_charts.

Young, D.B. (1998) "Blueprint for the white plague", *Nature*, 393, pp.515-516.

Zamudio, C., Krapp, F., Choi, H., Shah, L., Ciampi, A. et al. (2015) "Public Transportation and Tuberculosis Transmission in a High Incidence Setting", *Public Library Of Science ONE*, 10(2), p.e0115230.

Zetola, N., Shin, S., Tumedi, K., Ncube, R., Nicol, M. et al. (2014) "Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by genexpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes", *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), pp.2422–2429.

Zumla, A., Chakaya, J., Centis, R., Ambrosio, L., Mwaba, P. et al. (2015) "Tuberculosis treatment and management - an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies", *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(3), pp.220–234.

Zwerling, A., White, R., Vassall, A., Cohen, T., Dowdy, D. et al. (2014) "Modeling of novel diagnostic strategies for active tuberculosis - a systematic review: current practices and recommendations", *Public Library Of Science ONE*, 9(10), p.e110558.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO 1: CONVENÇÃO MIRU-VNTR

Tabela 14 - Convenção MIRU-VNTR. Adaptado de Suplly et al., 2006

Convenção MIRU-VNTR		
154	MIRU 02	
424	VNTR 42	
577	VNTR 43	ETRC
580	MIRU 04	ETRD
802	MIRU 40	
960	MIRU 10	
1644	MIRU 16	
1955		
2059	MIRU 20	
2163b		QUB 11b
2165	ETRA	
2347	VNTR 46	
2401	VNTR 47	
2461	VNTR 48	
2531	MIRU 23	
2687	MIRU 24	
2996	MIRU 26	
3007	MIRU 27	QUB 5
3171	VNTR 49	
3192	MIRU 31	ETRE
3690	VNTR 52	
4052		QUB 26
4156	VNTR 53	QUB 4156C
4348	MIRU 39	

7.2 ANEXO 2: SEQUÊNCIA DE *PRIMERS*

Tabela 15 - Sequência de *Primers* utilizados para realização do PCR por MIRU-VNTR. Adaptado de Suplly et al 2006.

Multiplex	Locus	Alelo	Tamanho (pb)	Pares de <i>primers</i> (de 5' para 3' com marcação em evidência)
Mix 1	580	MIRU 04	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGCCAGC
	2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (HEX)
	802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
Mix 2	960	MIRU 10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
	1644	MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (HEX)
	3192	MIRU 31	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
Mix 3	424	42	51	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC (FAM)
	577	43	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
	2165	ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
Mix 4	2401	47	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
	3690	52	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
	4156	53	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (NED)
Mix 5	2163b	QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)
	1955		57	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA
	4052	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT (NED) CGGCCGTGCCGCCAGGTCCTTCCCGAT

Tabela 165 (cont.) - Sequência de *Primers* utilizados para realização do PCR por MIRU-VNTR. Adaptado de Suplly et al., 2006.

Multiplex	Locus	Alelo	Tamanho (pb)	Pares de <i>primers</i> (de 5' para 3' com marcação em evidência)
Mix 6	154	MIRU 02	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT (FAM)
	2531	MIRU 23	53	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG (HEX) AGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTC
	4348	MIRU 39	53	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG (NED) AGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTC
Mix 7	2059	MIRU 20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
	2687	MIRU 24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (HEX)
	3007	MIRU 27	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)
Mix 8	2347	46	57	GCCAGCCGCGCGTGATATAACCT (FAM) AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
	2461	48	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (VIC) CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
	3171	49	54	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA (NED) GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC

7.3 ANEXO 3: PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PARA EXTRACÇÃO DE DNA

Buffer TE 10X: dissolveu-se 100 mM de Tris/HCL a pH 8 e 10 mM de EDTA em água destilada. A solução foi a autoclavar e mantida á temperatura ambiente até um ano.

Buffer TE 1X: Adicionou-se 1 volume de Buffer TE 10X para 9 volumes de água destilada. A solução foi a autoclavar e pode ser mantida á temperatura ambiente até um ano.

Lisozima a 10 mg/ml em água destilada guardada em alíquotas a -20°C até um ano.

SDS 10%: 10 g de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) por 100 ml de água destilada. A solução foi dissolvida a 65°C durante 20 minutos.

Solução de SDS/Proteinase K: Foi preparada no dia da sua utilização. Adicionou-se 70 µl de SDS 70% a 5µl de proteinase K 10 mg/ml por cada amostra e foi ao vortex vigorosamente.

NaCl 5M: Junta-se 29,2 g de NaCl por 100 ml de água destilada. Foi a autoclavar e pode ser mantida á temperatura ambiente até um ano.

Solução de CTAB/NaCl: Foram dissolvidas 4,1 g de NaCl em 80 µl de água destilada. Adicionou-se 10 g de CTAB (*M-cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide*) e dissolveu-se a 65°C. O volume foi ajustado para os 100 ml com água destilada. Manter á temperatura ambiente até seis meses.

Cloroformio/álcool Isoamilico: Fazer uma diluição de 1:24. Pode ser mantida á temperatura ambiente até um ano.

7.4 ANEXO 4: PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA SPOLIGOTYPING

Antes de se iniciar a técnica é necessário preparar todas as soluções necessárias.

Para preparação de 1 litro de SSPE a 20x adicionou-se 175,3 g de NaCl, 27,6 g de NaH_2PO_4 , 7,4 g de EDTA, fez-se o volume até aos 800 ml e ajustou-se o pH para 7,4. Fez-se novamente o volume da solução para os 1000 ml e vai a autoclavar. Para preparação de 200 ml de SDS a 10% adicionou-se 20 g de SDS em água bidestilada, não é necessário autoclavar. O EDTA, 1 litro, foi preparado com 7,4 g de EDTA, adicionou-se 800 ml de água bidestilada, ajustou-se o pH para 7,4 e fez-se o volume, a solução vai a autoclavar.

Após a preparação do SSPE 20x, preparou-se 500 ml de SSPE a 2x. De seguida foram preparadas as restantes soluções: 1 litro de SSPE 2x / 0,1% SDS e 1 litro de SSPE 2x / 0,5% de SDS.

7.5 ANEXO 5: DILUIÇÃO DOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Tabela 16 - Diluição dos oligonucleótidos utilizados no Spoligotyping. Adaptado.

	<i>stock</i> (pmol/μl)	Diluição 1					Diluição 2			
		<i>volume stock</i> (μl)	<i>volume dH2O</i> (μl)	<i>diluição 1</i> (pmol/μl)	<i>volume diluição 1</i> (μl)	<i>volume diluição 1</i> (μl)	<i>volume de NaHCO3</i> (μl)	<i>volume final diluição 2</i> (μl)	<i>diluição 2</i> (pmol/168μl)	<i>diluição 2</i> (pmol/150μl)
SP1	100	2,5	47,5	5,0	50	9,6	162,4	172	48,0	41,9
SP2	100	7,2	42,8	14,4	50	2,8	165,2	168	40,3	36,0
SP3	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP4	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP5	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP6	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP7	100	5	45	10,0	50	8,96	159,04	168	89,6	80,0
SP8	100	16	34	32,0	50	5,6	162,4	168	179,2	160,0
SP9	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP10	100	3	47	6,0	50	2,8	165,2	168	16,8	15,0
SP11	100	6	44	12,0	50	2,8	165,2	168	33,6	30,0
SP12	100	12	38	24,0	50	2,8	165,2	168	67,2	60,0
SP13	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP14	100	6	44	12,0	50	2,8	165,2	168	33,6	30,0
SP15	100	19	31	38,0	50	8	160	168	304,0	271,4
SP16	100	2,5	47,5	5,0	50	5,6	162,4	168	28,0	25,0
SP17	100	20	30	40,0	50	2,8	165,2	168	112,0	100,0
SP18	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP19	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP20	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP21	100	16	34	32,0	50	8,4	159,6	168	268,8	240,0
SP22	100	2,5	47,5	5,0	50	5,6	162,4	168	28,0	25,0
SP23	100	10	40	20,0	50	2,8	165,2	168	56,0	50,0
SP24	100	10	40	20,0	50	2,8	165,2	168	56,0	50,0
SP25	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP26	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP27	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP28	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP29	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP30	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP31	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP32	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP33	100	20	30	40,0	50	2,8	165,2	168	112,0	100,0
SP34	100	5	45	10,0	50	8,96	159,04	168	89,6	80,0
SP35	100	2,5	47,5	5,0	50	5,6	162,4	168	28,0	25,0
SP36	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5

Tabela 16 (cont.) - Diluição dos oligonucleótidos utilizados no Spoligotyping. Adaptado.

	Diluição 1						Diluição 2			
	<i>stock</i> (pmol/μl)	volume <i>stock</i> (μl)	volume dH ₂ O (μl)	diluição 1 (pmol/μl)	volume diluição 1 (μl)	volume diluição 1 (μl)	volume de NaHC O3 (μl)	volume final diluição 2 (μl)	diluição 2 (pmol/168 μl)	diluição 2 (pmol/150 μl)
SP37	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP38	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP39	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP40	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP41	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP42	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP43	100	16	34	32,0	50	2,8	165,2	168	89,6	80,0